

Bindungseigenschaften
monoklonaler Antikörper
gegen Gliome des Menschen
in vitro und in vivo

Brigitte Martin

Disbui. München

1988

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen
Gliome des Menschen in vitro und in vivo

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Brigitte Martin
aus München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

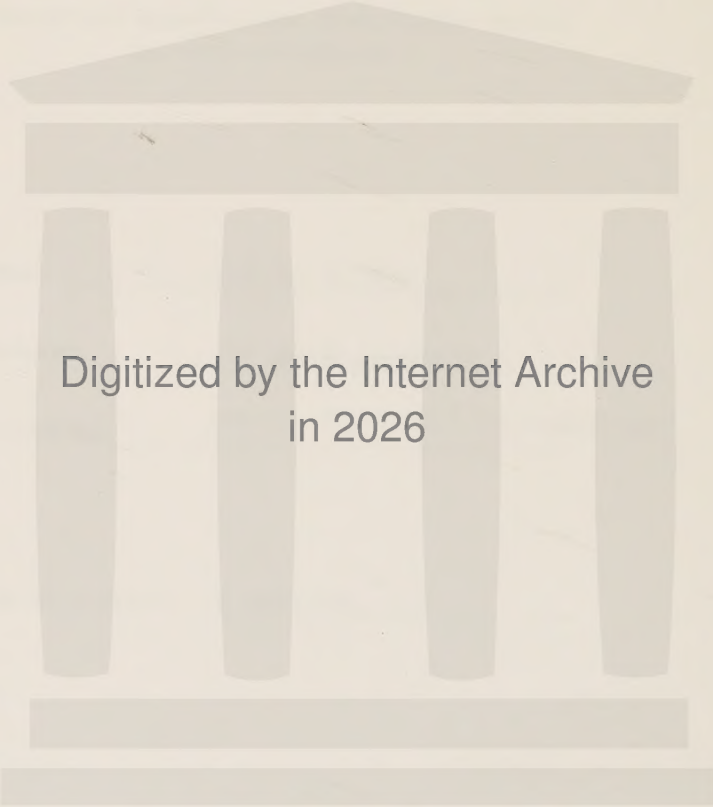
Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: _____ Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: _____ Priv.Do. Dr. Dr.habil. M. Stangassinger

Tag der Promotion: _____ 29. Juli 1988

MEINER MUTTER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0009

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	3
I. Antigenität von Hirntumoren	3
II. Heterogenität von Tumoren	5
III. Monoklonale Antikörper	6
IV. Wirkung von nativen monoklonalen Antikörpern	7
V. Konjugation zytotoxischer Substanzen an monoklonale Antikörper	9
VI. Radioimmundarstellung von Tumoren	12
C. PROBLEMSTELLUNG	15
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
I. Material und Methoden	16
1. Versuchstiere	16
2. Zellmaterial	16
2.1 Gliomzelllinien humanen Ursprungs	16
2.2 Permanente Rattengliomzelllinie	17
2.3 Embryonale Zellen des Menschen	18
2.4 Myelomzelllinie	18
2.5 Hybridomzellkulturen	18
2.6 Mäuseperitonealzellen	19
2.7 Konservierung von Zellen	19
3. Produktion monoklonaler Antikörper	20
3.1 Immunisierungsverfahren	20
3.2 Zellfusionen	21
4. Nachweis gliombindender Antikörper	23
4.1 Mikro-ELISA	23
4.2 Indirekte Immunperoxidasefärbung (Zellen)	24
5. Untersuchung der Spezifität selektierter Hybridomprodukte	26
5.1 Indirekte Immunperoxidasefärbung (Kryostatschnitte)	26
5.2 Indirekte Immunfluoreszenz	27

6.	Anreicherung von monoklonalen Antikörpern	27
6.1	Anreicherung in vitro durch serumfreien Kulturüberstand	27
6.2	Anreicherung in vivo durch Aszitesproduktion	28
7.	Gewinnung der monoklonalen Antikörper	28
7.1	Ammoniumsulfatpräzipitation	28
7.2	Protein-A-Sepharose-Affinitätschromatographie	29
8.	Bestimmung der Immunglobulinisotypen	30
8.1	Agargel-Immunodiffusion	30
8.2	ELISA-Verfahren	31
9.	Darstellung gliomassoziierten Antigens mittels monoklonaler Antikörper (Western-Blot)	32
9.1	Präparation von Membranantigenen	32
9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
9.3	Western-Blot	33
9.4	Immunochemischer Nachweis gliomassoziierten Antigens und Molekulargewichtsbestimmung	34
10.	Konjugation von MUC 2-63 an Daunomycin	35
10.1	Konjugationsprotokoll	35
10.2	Quantitative Zusammensetzung des Konjugates	36
10.3	Nachweis der Bindungsfähigkeit des konjugierten Antikörpers mittels IPF	37
11.	Mikrozytotoxizitätstest	37
12.	Effekt von Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 in vitro	38
12.1	Proliferationshemmung der Zielzellen	38
12.2	Vitalitäts- bzw. Aktivitätsbestimmung (MTT-Test)	39
13.	Bindungsverhalten von MUC 8-22 und MUC 2-63 in vivo	40
13.1	Transplantationstumoren	40
13.2	Markierung der Antikörper mit Jod-131	40
13.3	Externe Szintigraphie	41
II.	Ergebnisse	42
1.	Produktion und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	42
1.1	Immunisierungs- und Fusionsprotokolle	42
1.2	Ausbeute an Hybridomen	42

1.3 Selektion gliombindender Antikörper aus den Fusionen 1-11	46
1.3.1 Spezifitätsuntersuchungen	46
1.3.2 Kreuzreaktivität	46
1.3.3 Bindungsverhalten an nativen bzw. fixierten Zellen	48
1.4 Selektion gliombindender Antikörper aus der Fusion 12	50
1.5 Lokalisation des Reaktionsproduktes von MUC 8-22 und MUC 2-63 mittels indirekter Immunfluoreszenz	51
1.6 Bestimmung der Immunglobulinsubklassen	51
1.7 Anreicherung und Reinigung der monoklonalen Antikörper	53
2. Antigencharakterisierung	53
3. Natürliche und Komplement-vermittelte Zytotoxizität von nativem MUC 2-63	55
4. Konjugation von MUC 2-63 an Daunomycin	56
4.1 Bindungsfähigkeit von nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63	58
4.2 Beeinflussung der Tumorzellproliferation in vitro durch nativen und Daunomycin-konjugierten MUC 2-63	59
4.3 Beeinflussung der Vitalität bzw. Stoffwechselaktivität der Gliomzellen durch Inkubation mit nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 (MTT-Test)	62
5. Bindungsverhalten der Jod-131 markierten monoklonalen Antikörper MUC 8-22 und MUC 2-63 in vivo	65
5.1 Externe Szintigraphie	65
5.2 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Jod-131 markierten MUC 2-63	65
E. DISKUSSION	71
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	81
G. LITERATURVERZEICHNIS	85

A. EINLEITUNG

Maligne Tumoren des Zentralnervensystems, insbesondere anaplastische Gliome, zählen zu den prognostisch ungünstigsten Krebserkrankungen. Konventionelle therapeutische Maßnahmen zeigen vor allem in der Neuroonkologie unbefriedigende Resultate, da viele Gliome operativ, wenn überhaupt, nur partiell zugänglich sind und mittels Strahlen- und Chemotherapie nur unter erheblichen Nebenwirkungen beeinflußt werden können (GRAHMANN et al., 1984; BULLARD und BIGNER, 1985). Daher verlagerten sich die Forschungsschwerpunkte der letzten Jahre zunehmend auf immunologische Fragestellungen. Dies führte nach ausgedehnten Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunreaktionen dazu, daß die Expression tumorassoziierter Antigene spontaner und experimentell induzierter Tumoren postuliert wurde.

Erst seit der Einführung der Hybridomtechnologie durch KÖHLER und MILSTEIN (1975) wurde es möglich, sogenannte monoklonale Antikörper (mAk), das heißt Immunglobuline von definierter Spezifität und hohem Reinheitsgrad, gegen einzelne antigene Determinanten in beliebiger Menge zu produzieren. Seither konnte eine Vielzahl tumorassoziierter Antigene (TAA) dargestellt und charakterisiert werden (LLOYD, 1983). Gliomassozierte Antigene (GAA) wurden sowohl an chemisch induzierten Rattengliomen (STAVROU et al., 1983) als auch an spontanen Hirntumoren des Menschen (CAIRNCROSS et al., 1982; STAVROU et al., 1987) mittels mAk nachgewiesen.

Ebenso wurde es möglich, an in vitro kultivierten Tumorzellen Antigen-Antikörper-Reaktionen unter standardisierbaren Bedingungen zu untersuchen. Dabei fanden neben den Bindungseigenschaften einzelner mAk vor allem deren Auswirkung auf das biologische Verhalten wie Proliferationsgeschwindigkeit, Adhärenzfähigkeit und Stoffwechselaktivität der Zielzellen Interesse. Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde vielfach von mAk mit antitumoraler Wirkung sowohl in vitro als auch am Nacktmausmodell berichtet (KIRCH und HAMMERLING, 1981; VOLLMERS und BIRCHMEIER, 1983; HERLYN et al., 1985; STAVROU et al., 1986a).



Die definierte Spezifität monoklonaler Antikörper gegen TAA ließ sie schon bald als geeignete Trägermoleküle für radioaktive Isotope bzw. zytotoxische Substanzen erscheinen (BOURDON et al., 1984; EMBLETON, 1987). Mit Hilfe radioaktiv markierter mAk konnten bereits zahlreiche Radioimmundarstellungen von experimentellen und spontanen Tumoren durchgeführt werden, wobei teilweise auch therapeutische Erfolge erzielt wurden (KEENAN et al., 1985; GOLDENBERG et al., 1987).

Während über Verbindungen der mAk mit unspezifischen Immunmodulatoren, wie zum Beispiel Interferone und Interleukine noch sehr wenige Berichte vorliegen (VOGEL, 1987; OLDHAM, 1987), wurden zahlreiche Untersuchungen über Konjugationen an hochtoxische Pflanzentoxine wie Ricin und Abrin durchgeführt (SPITLER, 1987). Als eine vielversprechende Möglichkeit bietet sich die Koppelung der mAk an herkömmliche Zytostatika wie Daunomycin an, wodurch bekannte Nebenwirkungen der Chemotherapie infolge einer hohen Anreicherung des Zytostatikums im Tumorgewebe gesenkt werden könnten.

Trotz eingehender in vitro Untersuchungen (ARNON und SELA, 1982a,b; GALLEGRO et al., 1984; SELA und HURWITZ, 1987) sind solche Konjugate klinisch kaum geprüft worden. Dies umso mehr, als zahlreiche experimentelle Untersuchungen über ihr biologisches Verhalten und ihre Pharmakokinetik noch nötig sind. Auch die mAk müssen optimiert werden, da sie oft eine mehr oder weniger starke Kreuzreaktivität mit Normalgewebe aufweisen.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit die Grundlagenforschung zu intensivieren, um durch Einbeziehung immundiagnostischer und immuntherapeutischer Verfahren neue Möglichkeiten in der Tumorbekämpfung aufzuzeigen.

Verwendete Abkürzungen: AEC = 3-Amino-9-äthylcarbazol; AFP = alpha-Fetoprotein; CEA = "carcinoembryonic antigen"; DC = Dünnschichtchromatographie; DM = Daunomycin; DMFA = N,N-Dimethylformamid; DMSO = Dimethylsulfoxid; FBS = fetales bovines Serum; GAA = gliomassoziierte Antigene; HAT = Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin; Ig = Immunglobulin; IPF = indirekte Immunperoxidasefärbung; IT = Immunotoxine; mAk = monoklonale Antikörper; PBS = Phosphatgepufferte Saline (mit Ca- und Mg-Ionen); PBS-A = Phosphat-gepufferte Saline (ohne Ca- und Mg-Ionen); PEG = Polyäthylenglykol; RT = Raumtemperatur; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; STV = Saline-Trypsin-Verseine-Lösung; TAA = tumorassoziierte Antigene; TNBS = Trinitrobenzensulfonsäure;

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Antigenität von Hirntumoren

Die Annahme, daß Tumorzellen quantitativ und qualitativ veränderte Antigenstrukturen gegenüber normalen Zellen exprimieren, kann heute als gesichert gelten (KENNETT et al., 1980a; LLOYD, 1983, 1987).

Die Existenz gliomassoziierten Antigene (GAA) ist durch Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunreaktionen sowohl bei Gliompatienten (WAHLSTRÖM et al., 1973; KORNBLITH et al., 1974; SOLHEID et al., 1976; SHEIK et al., 1977; PFREUNDSCHUH et al., 1978; COAKHAM et al., 1980) als auch bei experimentellen Gliomen (CRAVIOTO, 1978; STAVROU et al., 1977, 1978a, 1980; BILZER et al., 1982), sowie durch die Herstellung von Heteroantisera gegen Gliome (TROUILLAS, 1971; COAKHAM, 1974; WAHLSTRÖM et al., 1974; COAKHAM und LAKSHMI, 1975; KEHAYOV, 1976; WIKSTRAND et al., 1977; STAVROU et al., 1978b) nachgewiesen worden.

Durch die Einführung der Hybridomtechnologie (KÖHLER und MILSTEIN, 1975) können einzelne antigene Determinanten auf Tumorzellen mittels hochspezifischer mAk erkannt werden.

WIKSTRAND und BIGNER (1985) teilen die bisher durch mAk definierten Antigene neuroektodermaler Tumoren in vier Gruppen ein:

a) Biochemisch definierte Zellmarker:

Dazu gehören die Proteine GFAP ("glial fibrillary acidic protein", ALBRECHTSEN et al., 1984) und S-100 ("soluble in 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ", LOEFEL et al., 1985), Galactocerebrosid (Differenzierungsmarker von Oligodendrozyten und Schwann'schen Zellen, RANSCHT et al., 1982) und verschiedene Ganglioside in den Zellmembranen von Melanom-, Gliom- und Neuroblastomzellen (CAHAN et al., 1982; PUKEL et al., 1982; DIPPOLD et al., 1984).

b) Antigene, die sowohl auf neuroektodermalen als auch auf lymphatischen Zellen vorkommen:

REIF und ALLEN (1964) stellten mit Hilfe polyvalenter Antisera eine Antigenverwandtschaft von Nervengewebe und lymphatischen Zellen fest.

Inzwischen konnten einige gemeinsame Antigene von neuroektodermalen und lymphatischen Zellen mittels mAk nachgewiesen werden: M22 (DIPPOLD et al., 1980), PI153 (KENNETT et al., 1980a; SEEGER et al., 1981), Thy-1 (SEEGER et al., 1982), OKT-8 (OGER et al., 1982), HLA-DR (CARREL et al., 1982a; de MURALT et al., 1985), PNET (HELSON et al., 1983) und CALLA (CARREL et al., 1983).

c) Neuroektodermale und onkofetale Marker:

Hierzu zählen gemeinsame Antigene verschiedener neuroektodermaler Tumoren wie Gliome, Melanome und Neuroblastome (MITCHELL et al., 1980; IMAI et al., 1981; SEEGER et al., 1981; CARREL et al., 1982b) sowie Differenzierungsantigene, die außer auf neuroektodermalen Tumorzellen auch auf fetalen Zellen nachweisbar sind (DIPPOLD et al., 1980; LIAO et al., 1981; WIKSTRAND und BIGNER, 1982; CAIRNCROSS et al., 1982; de MURALT et al., 1985; STAVROU et al., 1987).

d) Tumorassoziierte Antigene:

Nur wenige der bisher bekannten mAk reagieren ausschließlich mit der zur Immunisierung verwendeten Tumorart. Diese wurden bei spontanen Gliomen (SIKORA und ALDERSON, 1982) und Melanomen (HOUGHTON et al., 1983), sowie bei experimentellen Gliomen (STAVROU et al., 1983) beschrieben. Meist ist jedoch eine, wenn auch schwache, Kreuzreaktivität feststellbar.

CAIRNCROSS et al. (1982) entwickelten mAk gegen Astrozytomzellkulturen, die vorzugsweise neuroektodermale Antigene erkennen, aber auch eine schwache Bindung an Nierenkarzinomzellen und normalem adulten Hirngewebe zeigen. Ebenso konnten de TRIBOLET et al. (1983) mAk gegen Gliome produzieren, die aber auch schwach mit einem Kolonkarzinom und reaktiven Astrozyten in der peritumoralen weißen Substanz reagieren.

GRAHMANN et al. (1984) berücksichtigen in einer ähnlichen Einteilung noch extrazelluläre Matrixantigene, die für Zellproliferation, Differenzierung und Adhäsion von Tumorzellen wichtig sein sollen. BOURDON et al. (1983) konnten mittels eines mAk gegen die GFAP-positive Gliomzelllinie U-251 MG das GMEM ("glioma-mesenchymal extracellular matrix")-Antigen nachweisen, das in der Basalmembran von Endothelproliferationen, jedoch nicht im normalen adulten oder fetalen Hirn vorkommt und als Gliommarker in vitro und in vivo angesehen wurde.

II. Heterogenität von Tumoren

Die Heterogenität von Tumoren und daraus etablierten Zellkulturen bezüglich ihrer Antigenexpression konnte unter Verwendung monoklonaler Antikörper mittels Immunhistologie (KENNET et al., 1980a; WIKSTRAND et al., 1983), Zytotoxizitätstest (YEH et al., 1981; DIPPOLD et al., 1984; STAVROU et al., 1984) und indirekter Immunfluoreszenz (YEH et al., 1981; NATALI et al., 1983; STAVROU et al., 1983) nachgewiesen werden.

Die Heterogenität von Gliomen ist in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht von besonderer Bedeutung (GRAHMANN et al., 1984). In mehreren Untersuchungen wurde die genotypische Heterogenität von Gliomzellen durch Unterschiede in Chromosomenanzahl, Markerchromosomen und DNS-Gehalt gezeigt (SHAPIRO et al., 1981; BIGNER et al., 1981, 1982, 1983). Die phänotypische Heterogenität von Tumoren ist gekennzeichnet durch Unterschiede in Morphologie, Wachstumseigenschaften, Expression von biochemischen Markern, Expression membranständiger und intrazellulärer GAA, Tumorigenität in Nacktmäusen und Reaktion auf Chemotherapeutika (ALBINO et al., 1981; BIGNER et al., 1981, 1982; BULLARD et al., 1981; WIKSTRAND et al., 1983; SHAPIRO et al., 1985).

MORGAN et al. (1987) führen folgende Erklärungen für die antigene Heterogenität an:

- Die Existenz von genetisch stabilen Varianten in einer Tumorzellpopulation, die keine bzw. deutlich weniger Tumormarker synthetisieren oder exprimieren (YEH et al., 1981).
- Das Differenzierungsstadium einer Tumorzellpopulation kann die Markerexpression beeinflussen; so wird z.B. CEA ("carcinoembryonic antigen") von differenzierten Kolonkarzinomen verstärkt exprimiert (NAKAPOULOU et al., 1982).
- Nachdem einige Antigene trypsinempfindlich sind (MORGAN et al., 1981) und in lytischen bzw. nekrotischen Tumorarealen zahlreiche Proteasen vorhanden sind, kann es zur Antigenfragmentation mit Epitopverlusten kommen.
- Während verschiedener Zellzyklusphasen kann die Antigenexpression variabel sein (SARKAN et al., 1980; BURSHIEL et al., 1982).

III. Monoklonale Antikörper

Die Darstellung tumorassoziierter Antigene mittels polyklonaler Antisera ist infolge heterogener Antikörperpopulationen und niedriger Antikörpertiter problematisch und setzt umfangreiche Absorptionsschritte mit normalem Gewebe voraus, um Antikörper gegen Histokompatibilitätsantigene zu entfernen (COAKHAM, 1974).

KÖHLER und MILSTEIN (1975) gelang es, durch Verschmelzung von sensibilisierten Milzzellen mit Immunglobulin-produzierenden Myelomzellen Hybridzellen (Hybridome) herzustellen, die die Eigenschaften beider Elternzellen in sich vereinigten, nämlich einerseits die Antikörperproduktion der Plasmazelle und andererseits die Immortalität der Myelomzelle. Mit einer bereits 1964 von LITTLEFIELD entwickelten Methode (HAT-Selektion) können durch Verwendung eines Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltigen Mediums nur fusionierte Myelomzellen überleben.

Mittlerweile konnten als Fusionspartner Myelomzellen etabliert werden, die keine eigenen Immunglobuline synthetisieren (KEARNEY et al., 1979), wodurch Hybridome entstehen, die nur die von den DNS-Sequenzen des B-Zell-Partners codierten Immunglobuline sezernieren.

Auf diese Weise wurden monoklonale Antikörper gegen eine Vielzahl von Tumoren des Menschen entwickelt und TAA konnten genauer untersucht und neu definiert werden. So wurden mAk gegen die bereits in den siebziger Jahren bekannten und als Serummarker für die Tumoraktivität von Krebspatienten verwendeten onkofetalen Antigene CEA (GOLD und FREEDMAN, 1965; LEVIN et al., 1982; BERNIER et al., 1984) und AFP (alpha-Fetoprotein, ABELEV, 1968; TSUKADA et al., 1982; HIRAI et al., 1983) hergestellt.

Außerdem wurden mAk produziert, die gegen Transferrin-Rezeptoren (TROWBRIDGE und DOMINGO, 1981) oder gegen Hormonrezeptoren wie EGF ("epithelial growth factor"; SELA und HURWITZ, 1987) und HCG ("human chorionic gonadotropin"; OELTMAN und HEATH, 1979) gerichtet sind.

Darüberhinaus finden insbesondere die mAk größtes Interesse, die TAA erkennen. Unter anderem wurden mAk hergestellt gegen Melanome (YEH et al., 1979; HERLYN et al., 1979; MITCHELL et al., 1980; DIPPOLD et al.,

1980, 1984; MORGAN et al., 1981; SEEGER et al., 1981; CARREL et al., 1982b; HELLSTRÖM et al., 1983; BUMOL et al., 1983), Lungenkarzinome (MINNA et al., 1981), Osteosarkome (EMBLETON et al., 1983; GALLEG0 et al., 1984), Neuroblastome (KENNETT et al., 1979, 1980a; SEEGER et al., 1981; CARREL et al., 1982b), Lymphome (NADLER et al., 1980; MILLER et al., 1982, 1983; MEEKER et al., 1985), Kolorektalkarzinome (HERLYN et al., 1979, 1980; GILLILAND et al., 1980) und Glione (SCHNEGG et al., 1981; SEEGER et al., 1981; CAIRNCROSS et al., 1982; SIKORA und ALDERSON, 1982; de TRIBOLET et al., 1983; BOURDON et al., 1983; de MURALT et al., 1985; STAVROU et al., 1987).

Monoklonale Antikörper gegen TAA können immunhistochemisch zur in vitro Diagnose von Tumoren verwendet werden (KENNETT et al., 1980a; WIKSTRAND et al., 1983; STAVROU et al., 1987). Darüberhinaus werden zunehmend Versuche unternommen, mittels nativer mAk das Tumorstadium zu beeinflussen oder sie als Trägermoleküle für radioaktive bzw. zytotoxische Substanzen zu verwenden, um damit einerseits Tumoren in vivo darzustellen und andererseits deren Proliferation zu hemmen.

IV. Wirkung von nativen monoklonalen Antikörpern

Von zahlreichen Autoren wurde über eine antitumorale Wirkung von mAk in vitro berichtet. So konnte nach Inkubation mit nativen mAk gegen Mäuseleukämiezellen (BERNSTEIN et al., 1980), Maus-B16-Melanomzellen (VOLLMERS und BIRCHMEIER, 1983), Rattengliomzellen (STAVROU et al., 1984) und menschlichen Melanomzellen (DIPPOLD et al., 1984) eine Wachstumsdepression bzw. Zellysis beobachtet werden.

Auch das Tumorstadium in vivo bzw. die Metastasenbildung konnte im xenogenen System durch Verabreichung von mAk reduziert werden (BERNSTEIN et al., 1980, 1982; KIRCH und HAMMERLING, 1981; HERLYN und KOPROWSKI, 1982; VOLLMERS und BIRCHMEIER, 1983). Von Bedeutung scheint dabei die Immunglobulinsubklasse des verwendeten mAk zu sein. Es konnte mehrfach gezeigt werden, daß vor allem IgG2a-Antikörper antitumorale Wirkung sowohl in vitro, als auch in vivo aufweisen. HERLYN und KOPROWSKI (1982) fanden bei Therapieversuchen an tumortragenden Nackt-

mäusen von 33 untersuchten mAk verschiedener Subklassen nur IgG2a wirksam. Auch andere Untersucher kamen zu ähnlichen Ergebnissen (BERNSTEIN und NOWINSKI, 1982; SETO et al., 1983; DIPPOLD et al., 1984; HELLSTRÖM et al., 1985).

Dies könnte dadurch erklärt werden, daß die mAk neben einer Zell-vermittelten (HERLYN et al., 1979, 1982, 1985; BILZER et al., 1982) auch eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität zeigen und daß IgG2a-Antikörper der Maus eine starke Komplementbindungsfähigkeit aufweisen (GÖDING, 1986).

In klinischen Studien wurden mit Hilfe von mAk, im Sinne einer Serumtherapie, bislang jedoch nicht die erhofften Resultate erzielt. Dies dürfte mit der bereits angesprochenen Heterogenität der Tumoren (nicht jede Zelle wird von einem mAk erkannt) zusammenhängen. Daher wird oft eine Kombination von mAk gegen verschiedene antigene Determinanten vorgeschlagen (YEH et al., 1981; MARX, 1982; NATALI et al., 1983). Darüberhinaus ist die Versuchsanordnung im Tiermodell meist kritisch zu beurteilen. Bei den meisten in vivo Experimenten erhalten die Tiere den Antikörper kurz nach der Tumorzell-Inokulation oder die Zellen sind bereits mit mAk vorbehandelt, wodurch die erzielten Ergebnisse nicht auf das komplexe Tumorgeschehen beim Menschen übertragen werden können. STAVROU et al. (1986a) beobachteten, daß ein IgG2a-Antikörper gegen ein experimentelles Rattengliom in vitro wie in vivo antitumorale Wirkung zeigt, das Tumorstadium nach Beendigung der mAk-Injektionen jedoch schneller zunimmt als bei weiterbehandelten Tieren. Andere Untersucher berichten sogar von einem "Enhancement" des Tumorstadiums nach Verabreichung bestimmter mAk (KIRCH und HAMMERLING, 1981).

Beim Menschen ist bis jetzt nur ein Fall beschrieben, bei dem mit Hilfe eines anti-Idiotyp-Antikörpers bei einem B-Zell-Lymphompatienten eine sehr lange Remission erzielt werden konnte (MILLER et al., 1982). Aber in einer Folgestudie berichtete die gleiche Arbeitsgruppe, daß von zehn behandelten Patienten nur fünf mit einer kurzfristigen unvollständigen Remission auf die Antikörpergabe ansprachen (MEEKER et al., 1985). Auch NADLER et al. (1980) beobachteten nach Verabreichung eines mAk gegen ein lymphomassoziiertes Antigen einen Abfall zirkulie-

render Lymphomzellen, der jedoch nur für kurze Zeit anhielt. Neben leukämischen Erkrankungsformen konnten ähnliche Ergebnisse auch bei Hepatomen und gastrointestinalen Tumoren gezeigt werden (HAMBLIN et al., 1980; RITZ und SCHLOSSMAN, 1982; MILLER et al., 1983; HIRAI et al., 1983; SEARS et al., 1982, 1984).

Die Beobachtung von HOUGHTON et al. (1985), daß ein Melanompatient nach Verabreichung eines anti-Gangliosid-mAk mit generalisierter Urtikaria reagierte, weist auf das Problem einer möglichen Unverträglichkeit von Mausprotein im Tumorpatienten hin. Demgegenüber wurden von anderen Untersuchern kaum Reaktionen auf die Maus-Antikörper gesehen (RITZ und SCHLOSSMAN, 1982; OLDHAM et al., 1984; SCHROFF et al., 1984; SEARS et al., 1982, 1984), wenn streng darauf geachtet wird, daß sie frei von Pyrogenen, Mausviruspartikel und Hybridomnukleinsäuren sind (LEVY et al., 1984).

Intravenös applizierte mAk zeigen nur selten Einfluß auf das Tumorstadium, lagern sich aber spezifisch im Tumorgewebe an, wie von OLDHAM et al. (1984) mittels Immunperoxidasefärbung an Melanommetastasen gezeigt werden konnte. Dies läßt die Verwendung von mAk als Trägermoleküle für radioaktive bzw. zytotoxische Substanzen als sinnvoll erscheinen (GOODMAN et al., 1985).

V. Konjugation zytotoxischer Substanzen an monoklonale Antikörper

Ein Molekül von den pflanzlichen Toxinen Ricin oder Abrin reicht aus, um eine Zelle zu zerstören (EIKLID et al., 1980). Diese hohe zytotoxische Potenz ließ sie als ideale Konjugationspartner für mAk gegen TAA erscheinen. In zahlreichen in vitro Untersuchungen konnte die Effektivität solcher Konjugate bestätigt werden (OELTMAN und HEATH, 1979; GILLILAND et al., 1980; KROLICK et al., 1980, 1981, 1982a,b; HOUSTON und NOWINSKI, 1981; TROWBRIDGE und DOMINGO, 1981; BLYTHMAN et al., 1981; THORPE et al., 1982, 1984; JANSEN et al., 1982; LEVIN et al., 1982; RASO et al., 1982; CASELLAS et al., 1982; BUMOL et al., 1983; RAMAKRISHNAN und HOUSTON, 1984; HWANG et al., 1984; BJORN et al., 1985; MORGAN et al., 1985, 1987; SPITLER, 1987).

Die Lectine Abrin und Ricin bestehen aus zwei funktionell verschiede-

nen Polypeptidketten: Die B-Kette bindet an Galaktose-haltige Bestandteile der Zellmembran und die A-Kette hemmt enzymatisch die Proteinsynthese an den 60 S-Untereinheiten der Ribosomen (OLSNES und PIHL, 1982). Um eine unspezifische Toxizität durch die Bindungsfähigkeit der B-Ketten zu vermeiden, wurden für in vivo Experimente meist Konjugate zwischen A-Ketten und mAk hergestellt (Immunotoxine), wodurch jedoch die Wirksamkeit oft erheblich reduziert war (THORPE et al., 1984; RAMAKRISHNAN und HOUSTON, 1984). BLYTHMAN et al. (1981) zeigten am Nacktmausmodell, daß solche Immunotoxine (IT) nur dann antitumoral wirksam waren, wenn der Tumor noch nicht zu groß war. Eine Erklärung dafür könnte die Beobachtung von MORGAN et al. (1987) geben, wonach sich nativer mAk (Halbwertszeit 36 Stunden) bis zu 15 mal stärker im Tumor anreicherte als das entsprechende Ricin-Konjugat (Halbwertszeit 6 Stunden). Ferner ist die stark immunogene Wirkung des Toxinbestandteils ein limitierender Faktor für die klinische Anwendung solcher IT (RAMAKRISHNAN und HOUSTON, 1984).

SPITLER et al. (1986) behandelten 22 Patienten mit metastasierenden Melanomen mit einem IT (Ricin-A-mAk) und konnten in einem Fall die Lungenmetastasen nicht mehr nachweisen (Beobachtungszeitraum 21 Monate) und bei den übrigen Patienten ein zum Teil verlangsamtes Wachstum der Metastasen beobachten.

Die klinische Bedeutung von IT erscheint derzeit vor allem in der extrakorporalen Behandlung von Knochenmarkstransplantaten zu liegen (VALLERA, 1987). Bei allogenen Transplantationen konnten FILIPOVICH et al. (1984) mittels IT gegen Spender-T-Lymphozyten eine "graft-versus-host" - Reaktion vermeiden und bei autologen Transplantationen konnten im Tierversuch 99,9% der Leukämiezellen zerstört werden, wobei sich die Stammzellen als resistent erwiesen (THORPE et al., 1982; KROLICK et al., 1982b).

Viele Autoren bevorzugten jedoch Immunkonjugate mit herkömmlichen Zytostatika, da bei ihnen Pharmakokinètik und Nebenwirkungen gut untersucht sind. Damit wird erwartet, daß einerseits die Nebenwirkungen auf rasch proliferierende nichttumoröse Zellen reduziert und andererseits die Tumorzellen gezielt zerstört werden (VOGEL, 1987; SELA und HUR-

WITZ, 1987). Voraussetzung für die Wirksamkeit solcher Konjugate ist, daß sowohl die Bindungsaktivität des Antikörpers als auch die Zytotoxizität des Pharmakons nach der Koppelung erhalten bleiben.

Zahlreiche Arbeitsgruppen berichteten von in vitro antitumoral wirksamen Konjugaten monoklonaler Antikörper mit Adriamycin (SUZUKI et al., 1981; PIMM et al., 1982; HURWITZ et al., 1983a; SELA und HURWITZ, 1987), Bleomycin (MANABE et al., 1983), Chlorambucil (TUNG et al., 1983; BERNIER et al., 1984; SMYTH et al., 1986), Daunomycin (SUZUKI et al., 1981; PAGE et al., 1981a,b; ARNON und SELA, 1982a,b; HURWITZ et al., 1983b; TSUKADA et al., 1982a,b, 1984, 1985; GALLEGRO et al., 1984; DIENER et al., 1985), Interferon (PELHAM et al., 1983; FLANNERY et al., 1984), Methotrexat (KULKARNI et al., 1981; GARNETT et al., 1983; VADIA et al., 1984; KANELLOS et al., 1985; ENDO et al., 1987; SELA und HURWITZ, 1987), Mitomycin C (SUZUKI et al., 1981; KATO et al., 1983), Neokarzinostatin (KIMURA et al., 1980; JUNG et al., 1981), Purothionin (IMAI et al., 1983), Quinon-Derivaten (BORATYNSKI und SYPER, 1983), Vindesin (JOHNSON et al., 1981; ROWLAND et al., 1981, 1983, 1985; EMBLETON et al., 1983; BALDWIN et al., 1984) und Zytostatika-haltigen Liposomen (MACHY et al., 1982; HASHIMOTO et al., 1983; HEATH et al., 1983; GREGORIADIS, 1984).

Diese wurden teilweise auch in vivo an tumortragenden Nacktmäusen erfolgreich getestet, wobei oft das Konjugat in einer geringeren Dosis als das freie Medikament wirksam war (BELLES-ISLES et al., 1980; PIMM et al., 1982; KULKARNI et al., 1981; VADIA et al., 1984; TSUKADA et al., 1982b, 1985; SELA und HURWITZ, 1987).

Dabei gelten Daunomycin und Adriamycin, zwei eng verwandte Antibiotika mit antitumoraler Wirkung, als Konjugationspartner der Wahl (SELA und HURWITZ, 1987). Sie sind interkalative Stoffe, das heißt sie besetzen die Zwischenräume zwischen den Basenpaaren der DNS-Doppelhelix und können dadurch deren identische Reduplikation mutativ stören (NOACK, 1981; FORTH, 1987).

HURWITZ et al. (1983a) konnten nach Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Konjugat, bestehend aus Adriamycin und einem mAk gegen Neuroblastomzellen, die stärkste Fluoreszenzintensität in der Kernfraktion der Neuroblastomzellen nachweisen. In der gleichen Studie

untersuchten sie die Auswirkungen dieses Konjugates auf die prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen und fanden nach Konjugateinwirkung eine starke Anhäufung in der G₂-Phase (bis zu 37% gegenüber 15% bei einer unbehandelten Tumorzellpopulation).

Demgegenüber zeigten TRITTON und YEE (1982), daß Adriamycin nur durch Oberflächenkontakt, ohne in die Zelle einzudringen, einen zytotoxischen Effekt hat.

Für die Konjugation von Daunomycin an mAk gibt es verschiedene Möglichkeiten: direkte Koppelung (SUZUKI et al., 1981; GALLEGO et al., 1984) oder mittels sogenannter "spacer" wie makromolekulares Dextran (MANABE et al., 1983; SELA und HURWITZ, 1987), Glutaraldehyd (HURWITZ et al., 1975; BELLES-ISLES et al., 1980; PAGE et al., 1981a,b), heterobifunktionelles SPDP (GALLEGO et al., 1984), Poly-L-Glutaminsäure-ederivat (TSUKADA et al., 1984, 1985) und cis-Aconitsäureanhydrid (SHEN und RYSER, 1981; GALLEGO et al., 1984; DIENER et al., 1985).

Die letzte Möglichkeit erscheint dabei als besonders geeignet, da diese Koppelung pH-sensitiv ist, wodurch die Konjugate im neutralen intravaskulären pH sehr stabil sind und das Medikament erst nach der Endozytose im sauren lysosomalen Milieu der Zielzelle seine zellschädigende Wirkung entfalten kann (SHEN und RYSER, 1981; DIENER et al., 1985).

Darüberhinaus werden durch diese Konjugationsform die Eigenschaften beider Partner, nämlich einerseits die Bindungsfähigkeit des mAk und andererseits die Zytotoxizität des Daunomycins am wenigsten beeinträchtigt (GALLEGO et al., 1984).

VI. Radioimmundarstellung von Tumoren

Hochspezifische mAk, gekoppelt an verschiedene Radioisotope, eröffnen neue Möglichkeiten in der Tumordiagnostik. Mittels Jod-131 markierter mAk gegen TAA gelang es, in Nacktmäuse transplantierte Tumoren szintigraphisch darzustellen (BALLOU et al., 1979; GOLDENBERG, 1983; NAKATA et al., 1984; HWANG et al., 1985; STAVROU et al., 1985a,b, 1986b; TAKAHASHI et al., 1987).

Dabei konnte zum Teil auch eine Tumor-Wachstumsdepression durch die

lokale Strahlenwirkung beobachtet werden (GHOSE et al., 1974, 1980; ZALCBERG et al., 1984).

Auch beim Tumorpatienten liegen bereits durchaus ermutigende Ergebnisse vor (KIM et al., 1980; ETTINGER et al., 1982; LARSON et al., 1983; PHILLIPS et al., 1983; EPENETOS et al., 1984, 1985; ORDER et al., 1984; MOLDOFSKY et al., 1984; CARRASQUILLO et al., 1984; DeLAND und GOLDENBERG, 1985; ROSEN et al., 1987). Okkulte Tumoren konnten teilweise bis zu einem Jahr vor anderen Verfahren nachgewiesen werden (GOLDENBERG et al., 1987). FARRANDS et al. (1982) gelang es, bei der Radioimmundarstellung eines Kolorektalkarzinoms auch intracerebrale Metastasen nachzuweisen, die bis dahin keine klinischen Symptome verursachten.

Neben einer hohen Hintergrundaktivität in blutreichen Organen besteht nach i.v. Applikation bei zirkulierenden Antigenen jedoch die Gefahr, daß die markierten mAk gebunden werden, bevor sie den Tumor erreichen (NAKATA et al., 1984). Deshalb wurde in manchen Untersuchungen eine regionale Applikationstechnik bevorzugt, wie intraperitoneal (EPENETOS, 1984), intraarteriell (EPENETOS et al., 1985) oder subkutan bei Lymphknotenmetastasen (WEINSTEIN et al., 1982, 1983).

Eine deutliche Verbesserung der Tumordarstellung durch erhöhte Blutclearance bei geringerer unspezifischer Gewebsbindung konnte mit Antikörperfragmenten, insbesondere mit bivalenten $F(ab')_2$ - Fragmenten erreicht werden (LARSON et al., 1983; WAHL et al., 1983; CARRASQUILLO et al., 1984; DOUILLARD et al., 1985; STAVROU et al., 1986b).

Jod-131 ist jedoch, infolge hochenergetischer Gammastrahlung in Verbindung mit zytotoxischer Betastrahlung bei relativ langer Halbwertszeit (8 Tage) und teilweiser in vivo Dejodierung des mAk (GOLDENBERG et al., 1987), für diagnostische Zwecke kein optimales Radionuklid. Daher wurden auch Untersuchungen mit anderen Isotopen wie Yttrium-90, Technetium-99m und Indium-111 durchgeführt (FAIRWEATHER et al., 1983; HALPERN et al., 1985; MURRAY et al., 1985).

Dabei zeigen jedoch Radiometalle wie Indium-111, über DTPA an monoklonale Antikörper gekoppelt, eine hohe unspezifische Anreicherung in Leber und Milz. Der reine Gammastrahler Technetium-99m würde sich gut eignen, hat aber nur eine Halbwertszeit von sechs Stunden und zerfällt dann zum langlebigen Betastrahler (RHODES et al., 1985).

Für eine mögliche Radioimmuntherapie sollte das eingesetzte Nuklid nach DeNARDO et al. (1983) folgende Eigenschaften aufweisen: einfacher Zerfall, physikalische Halbwertszeit bis zu drei Tagen und die meiste Energie sollte den Umkreis des 30-fachen Zelldurchmessers nicht überschreiten. Der limitierende Faktor der Radioimmuntherapie ist die Strahlungstoxizität auf Leber und Knochenmark, aber ein großer Vorteil der Isotopen-gekoppelten mAk ist der dabei erzielte "field-effect", das heißt auch die Tumorzellen werden geschädigt, die das entsprechende TAA nicht exprimieren (GOLDENBERG et al., 1987).

C. PROBLEMSTELLUNG

Eine große Anzahl monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene wurde bereits produziert und erfolgreich zur Tumordarstellung und für Therapieversuche eingesetzt. Jedoch liegen noch wenige Berichte über spezifische monoklonale Antikörper gegen gliomassoziierte Antigene humaner Hirntumoren vor (BOURDON et al., 1984; GRAHMANN et al., 1984).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein breites Spektrum an mAk gegen GAA zu produzieren und ihre Spezifität bzw. Kreuzreaktivität an verschiedenen Zelllinien und Kryostatschnitten zu überprüfen.

Dabei sollte insbesondere das Bindungsverhalten an kultivierten Gliomzellen und eine mögliche direkte oder Komplement-vermittelte zytotoxische Wirkung der mAk auf Gliomzellen untersucht werden.

Außerdem sollte nach Konjugation an Daunomycin (ein Antibiotikum mit antitumoraler Wirkung) geprüft werden, ob das Konjugat - unter Erhaltung sowohl der Immunreaktivität des Antikörpers als auch der Zytotoxizität des Daunomycins - auf Gliomzellen in vitro antitumorale Eigenschaften aufweist.

Darüberhinaus sollte die Eignung der monoklonalen Antikörper als radioaktiv markierte Moleküle zur in vivo Darstellung von in BALB/c-nu/nu-Mäuse transplantierten Tumoren untersucht werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere fanden 6-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts Verwendung. Sie dienten als Spender von sensibilisierten Splenozyten und von Peritonealzellen und wurden außerdem als Aszitesproduzenten für die Antikörperanreicherung in vivo benötigt. Sie erhielten als Standarddiät Altromin^R und Wasser ad libitum.

Zur Anzucht von Transplantationstumoren wurden die thymusaplastischen Nacktmausvarianten BALB/c-nu/nu bzw. NMRI-nu/nu verwendet. Diese Tiere wurden in einem separaten, keimarmen Raum mit beschränktem Personenverkehr gehalten und erhielten Altromin-Spezialfutter^R für Nacktmäuse und mit 1 M HCl angesäuertes Trinkwasser (pH 2,5 - 3,0) ad libitum.

2. Zellmaterial

2.1 Gliomzelllinien humanen Ursprungs

Zur Immunisierung, Tumortransplantation, regelmäßigen Selektion Immunglobulin-produzierender Hybridomklone sowie für Zytotoxizitätsexperimente wurden sowohl Kurzzeit- als auch permanente Tumorzelllinien verwendet (Tab. 1). Die Tumorzellen wurden aus Operationsmaterial (Abteilung für Neurochirurgie des Klinikums München - Bogenhausen) etabliert und als Langzeitkulturen in 50 ml bzw. 260 ml Plastikflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 1-63371 bzw. 1-53732) kultiviert. Als Nährmedium diente HC-Medium (HCM), d.h. als Grundmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Karlsruhe, Nr. 074-2100), dem pro Liter 10% fetales bovines Serum (FBS; Flow Laboratories, Meckenheim, Nr. 29-101-54), 10% NCTC-135 (Gibco, Karlsruhe, Nr. 041-01350), 1% Natriumpyruvat (Gibco, Karlsruhe, Nr. 043-01360), 100000 I.E. Penicillin, 0,1 g Streptomycin (Pen.-Strept.; Gibco, Karlsruhe, Nr. 061-5075) und 0,1 g Neomycin (Sigma, Deisenhofen, Nr. N-1876) zugesetzt wurden. Das FBS

wurde vor seiner Verwendung 30 min bei 56°C inkubiert, um mögliche Komplementfaktoren zu inaktivieren. Die Bebrütung der Kulturen erfolgte im offenen System bei 37°C und 5% CO₂-Begasung in gesättigter Wasserdampfatosphäre.

Dichtgewachsenen Kulturen wurden mit einer STV - Lösung (100 ml Saline 10-fach, 25 ml 1,25%ige Trypsinlösung, 50 ml 1%ige Versenelösung, Aqua bidest. ad 1000 ml) abtrypsiniert und je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:20 in neuen Flaschen subkultiviert.

Tabelle 1: Permanente Gliomzelllinien humanen Ursprungs

Tumor Nr.	Diagnose	Bezeichng.d. Zellkultur	Gliamarker	
			S-100	GFAP
N59/85	Glioblastom/ Sarkom	85HG-59	-	(+)
N63/85	Astrozytom II	85HG-63	+	+
N64/85	Glioblastom	85HG-64	+	+
N65/85	Glioblastom	85HG-65	+	+
N66/85	Astrozytom III	85HG-66	+	+
N39/86	Glioblastom	86HG-39	(+)	+

2.2 Permanente Rattengliomzelllinie

Bei der verwendeten Gliomzelllinie 79FR-G-41_{C8} handelte es sich um die achte intracerebrale Passage eines chemisch induzierten Rattenglioms (STAVROU et al., 1980), die als Langzeitkultur analog zu den Gliomzellen des Menschen gezüchtet und subkultiviert wurde. Die Bebrütung und die Handhabung der Rattenzellen erfolgten jedoch grundsätzlich in einem separaten Raum mit eigenen Gerätschaften.

2.3 Embryonale Zellen des Menschen

Unter sterilen Bedingungen wurden einem Embryo (N9/86; 9. Schwangerschaftswoche) ein Großteil der Hirnanlage und Proben von verschiedenen Körpersegmenten entnommen und davon sowohl Suspensions- als auch Explantationskulturen angelegt (PAUL, 1980). Die Zellen (86HE-9) wurden den Gliomzellen analog gezüchtet und konnten über zwanzigmal subkultiviert werden, bevor sie ihr Wachstum einstellten.

2.4 Myelomzelllinie

Als Fusionspartner für sensibilisierte Splenozyten von hyperimmunisierten BALB/c-Mäusen diente die "non-producer" BALB/c-Mäusemyelomzelllinie X63-Ag8.653 (KEARNEY et al., 1979). Diese Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Gliomzellen in Plastikflaschen gezüchtet und mechanisch durch Abrütteln im Verhältnis 1:2 bis 1:50 geteilt. Um die Azaguaninresistenz als Voraussetzung für die HAT-Selektion nach den Fusionen zu überprüfen, wurden regelmäßig pro Liter Medium 15 mg 8-Azaguanin (Sigma, Deisenhofen, Nr. A-8526) zugefügt. 24 Stunden vor einer Fusion wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und in HCM/20% FBS verbracht, wodurch sichergestellt wurde, daß sie sich bei der Fusion in einer optimalen logarithmischen Wachstumsphase befanden.

2.5 Hybridomzellkulturen

Die Antikörper-produzierenden Hybridomklone entstanden durch Fusionen von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) mit sensibilisierten Splenozyten von hyperimmunisierten BALB/c-Mäusen. Diese Zellen wurden als Dauerkultur in (24)-Linbroplatten (Greiner, Nürtingen, Nr. 662160) mit HCM/20% FBS und Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" im offenen System gezüchtet und bei Bedarf in Plastikflaschen überführt.

Die verschiedenen Hybridomklone wurden regelmäßig auf ihre Antikörperproduktion überprüft, indem der jeweilige Kulturüberstand im mikro-ELISA und in der indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) ausgetestet wurde.

Um sicherzustellen, daß die jeweiligen Antikörper wirklich monoklonal vorlagen und um ein mögliches Überwuchern der Zellen mit nicht produzierenden Varianten zu vermeiden, wurden sämtliche Hybridomklone mindestens alle 6 Wochen und nach jedem Auftauen eingefrorener Präparationen nach der Endpunktverdünnungsmethode (GODING, 1986) in (96)-Mikroplatten (Flow Lab., Meckenheim, Nr. 76-008-04) rekloniert. Es wurden jeweils nur die Subklone weiterkultiviert, die die höchste Antikörperproduktion aufwiesen.

2.6 Mauseperitonealzellen

Für ein optimales Wachstum der verschiedenen Hybridomklone wurden Mauseperitonealzellen als "feeder-layer" benötigt (SCHIMMELPFENG et al., 1980; SUGASAWARA et al., 1985). Dazu erhielten die Mäuse je 1,5 ml Thioglycollate^R-Medium (Difco Lab., Detroit, USA, Nr. 0256-01-0) als sterile 3%ige Lösung intraperitoneal (i.p.) appliziert und 48-72 Stunden später wurden die Tiere getötet. Ihre Bauchhöhle wurde unter sterilen Bedingungen ausgespült und die dabei erhaltene makrophagenreiche Zellsuspension 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem HCM/10% FBS resuspendiert, die Zellzahl mittels Coulter Counter (Coulter Electronics LTD, Harpenden, England) bestimmt und auf 10⁶/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl pro Vertiefung einer (96)-Mikroplatte (Flow Lab., Meckenheim) und 100 µl pro Vertiefung einer (24)-Linbroplatte (Greiner, Nürtingen) einpipettiert. Die Platten wurden 48 Stunden im offenen System bebrütet, bevor Hybridome darauf kultiviert werden konnten.

2.7 Konservierung von Zellen

Gliom-, Myelom- und Hybridomzellen wurden regelmäßig eingefroren, um bei schlechtem Wachstum bzw. nachlassender Antikörperproduktion auf frühere Passagen zurückgreifen zu können. Dazu wurden dem Nährmedium 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg, Nr. 20385) zugesetzt und jeweils 10⁶ Zellen in 1 ml Medium in sterile Cryotubes (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 3-63401) einpipettiert, 4 Stunden bei 4°C vorgekühlt und anschließend bei -80°C eingefroren (ASHWOOD-SMITH, 1961).

Zum Auftauen wurden die Cryotubes 2-3 min in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, die Zellen dann in 20 ml vorgewärmtem HCM/20% FBS aufgenommen (um das DMSO sofort zu verdünnen) und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem HCM/20% FBS resuspendiert und bei den Gliom- wie auch bei den Myelomzellen wurden pro Cryotube eine 50 ml Plastikflasche (Nunc, Roskilde, Dänemark) angelegt. Die Hybridomzellen eines Cryotubes wurden auf eine "feeder-layer"-haltige (96)-Mikroplatte (Flow Lab., Meckenheim) ausgesät, nach Dichtwachsen der Löcher der Überstand auf Antikörpergehalt getestet und die Zellen positiver Löcher wurden sofort kloniert.

3. Produktion monoklonaler Antikörper

3.1 Immunisierungsverfahren

6-8 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit Gliomzellen aus Operationsmaterial bzw. permanenten Gliomzelllinien sowie embryonalen Zellen (Tab. 2) immunisiert, wobei der Nacktmauspassage 85HG-66-T6 der Vorzug vor der originären Zellkultur gegeben wurde, da die in vivo passagierten Tumorzellen ein wesentlich besseres Wachstumsverhalten in vitro zeigten.

Tabelle 2: Zellmaterial zur Immunisierung

Tumor Nr.	Diagnose	Bezeichng.d. Zellkultur
N22/85	Astrozytom III	-
N59/85	Glioblastom/Sarkom	85HG-59
N63/85	Astrozytom II	85HG-63
N64/85	Glioblastom	85HG-64
N65/85	Glioblastom	85HG-65
N66/85-T6	6. Nacktmauspassage von N66/85 (Astrozytom III)	85HG-66-T6
N 9/86	Embryonales Hirngewebe (9. Schwangerschaftswoche)	86HE-9
N39/86	Glioblastom	86HG-39

Für die Grundimmunisierung wurden die Zellen TNBS-modifiziert (LEMONIER et al., 1977; STAVROU et al., 1980, 1981). Zur Herstellung einer 10 mM 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäurelösung (TNBS; Sigma, Deisenhofen, Nr. P-5878) wurden 293 mg TNBS in 100 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,4) gelöst. Die Zellen wurden abtrypsiniert und dreimal in PBS-A (Phosphat-gepufferte Saline, ohne Ca^{++} und Mg^{++} , pH 7,3) gewaschen. Die Zellzahl wurde im Coulter Counter bestimmt, ihre Konzentration auf $10^7/\text{ml}$ PBS-A eingestellt und mit 1 ml vorgewärmter TNBS-Lösung/ 10^7 Zellen versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min bei 37°C wurden die Zellen so oft mit PBS-A gewaschen, bis der Überstand wieder farblos war.

Bei der Grundimmunisierung erhielten die Tiere je 10^6 TNBS-modifizierte Zellen (suspendiert in 1 ml PBS-A), dreimal, in wöchentlichem Abstand, i.p. appliziert.

Nach einer Ruhezeit von mindestens drei Monaten wurden die Tiere drei Tage vor der Fusion mit $4-6 \times 10^6$ nativen Zellen i.p. geboostert, wobei jedoch bei 86HE-9 das Immunisierungsschema abgekürzt wurde, da das embryonale Gewebe keine permanente Zellkultur darstellte und demzufolge nicht unbegrenzt zur Verfügung stand. Es wurde nur zweimal grundimmunisiert (je 10^6 TNBS-modifizierte Zellen i.p.) und nach vier Wochen erfolgte die Boosterung mit 5×10^5 nativen Zellen intrasplenal (SPITZ et al., 1984).

Bei den Tieren, die mit 86HG-39 grundimmunisiert worden waren, wurde fraktioniert beboostert, das heißt an allen vier Tagen vor einer Fusion wurden je 8×10^5 native Tumorzellen i.p. injiziert (PETERS et al., 1985).

3.2 Zellfusionen

Die Zellfusionen zwischen sensibilisierten Splenozyten von hyperimmunisierten BALB/-Mäusen und den Myelomzellen (X63-Ag8.653) erfolgten in Anlehnung an WESTERWOUT (1985) und PETERS et al. (1985). Als Fusionsvermittler bei sämtlichen Fusionen diente Polyäthylenglykol (PEG 1500, Boehringer, Mannheim, Nr. 783641).

a) Vorbereitung der Myelomzellen:

Die Myelomzellen, die einen Tag vor der Fusion 1:2 geteilt und mit HCM/20% FBS gefüttert worden waren, wurden mechanisch abgerüttelt, bei 200 x g 5 min zentrifugiert, in 15 ml Medium resuspendiert und gezählt.

b) Präparation der Milzzellen:

3 Tage nach der Boosterung wurde die Milz hyperimmunisierter Tiere unter sterilen Bedingungen entnommen und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein Sieb (Maschenweite 60 µm) in eine Petrischale passiert, wobei ständig Medium zugetropft wurde. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 200 x g zentrifugiert, das Pellet in 10 ml HCM/20% FBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

c) Fusion:

Die Milzzellen wurden mit den Myelomzellen im Verhältnis 5:1 bis 10:1 vorsichtig gemischt und in einem runden Zentrifugenröhrchen 8 min bei 150 x g zentrifugiert. Die restlichen Myelomzellen wurden für HAT-Kontrollreihen aufgehoben.

Das Zellpellet wurde möglichst trocken gesaugt und 1 ml PEG während 1 min langsam zugetropft. Nach leichtem Suspendieren und 1 min Reaktionszeit (handwarm) begann die PEG-Verdünnung mit Fusionsmedium, d.h. serumfreies HCM, dem pro Liter 12 ml Natriumpyruvat (Gibco, Karlsruhe) und 3,5 ml einer 1%igen Na-EDTA-Lösung (Serva, Heidelberg, Nr. 11280) zugesetzt wurden. Dabei wurde folgender Zeitplan eingehalten:

- während 2 min 1 ml Fusionsmedium (serumfrei) zutropfen.
- während 3 min 2 ml Fusionsmedium (serumfrei) zutropfen.
- während 5 min 4 ml Fusionsmedium/20% FBS zutropfen.

Die Zellen wurden zweimal vorsichtig suspendiert, um eine gleichmäßige Durchmischung des PEG mit dem Fusionsmedium zu erreichen, und bei 150 x g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Fusionsmedium/20% FBS resuspendiert und 1 Stunde im offenen System inkubiert. Danach wurden die Zellen in 60 ml HAT-Selektionsmedium (LITTLEFIELD, 1964) aufgenommen und davon 200 µl pro Vertiefung mehrerer, "feeder-layer" enthaltender, (96)-Mikroplatten (Flow Lab., Meckenheim) einpipettiert. Auf jeder Platte wurde eine Reihe mit

unfusionierten Myelomzellen als Kontrolle für die HAT-Selektion angelegt. Das HAT-Medium bestand aus HCM/20% FBS und enthielt pro Liter 10 ml einer 0,04 mM Aminopterinlösung (Sigma, Deisenhofen, Nr. A-2255) und 10 ml einer gemeinsamen 10 mM Hypoxanthin- und 1,6 mM Thymidinvorsatzlösung (Sigma, Deisenhofen, Nr H-9377 bzw. T-9250). Die Platten wurden im offenen System in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert, wobei das HAT-Medium zweimal wöchentlich gewechselt wurde.

Ab dem 4. Tag war ein deutliches Koloniewachstum zu erkennen und als nach 10-14 Tagen alle unfusionierten Milzzellen und alle Myelomzellen in den Kontrollreihen abgestorben waren, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei wachsenden Kolonien um Hybridome handelte. Sobald die Plattenvertiefungen dicht bewachsen waren, wurden die Kulturüberstände auf Anwesenheit gliombindender Antikörper untersucht. Positive Kolonien wurden isoliert und sofort kloniert, wobei die Hybridome mit aminopterinfreiem HT-Medium gefüttert wurden. Nach einigen Wochen wurde normales HCM/20% FBS verwendet und der Serumanteil konnte, je nach Wachstumsverhalten der verschiedenen Klone, schrittweise auf 10-15% gesenkt werden.

4. Nachweis gliombindender Antikörper

4.1 Mikro-ELISA

Als erstes "screening"-Verfahren nach einer Fusion und im weiteren zur Quantifizierung der Antikörperproduktion in den verschiedenen Klonierungsstufen wurde der sog. "enzyme-linked-immunosorbent-assay" als mikro-ELISA, nach den Angaben von POSNER et al. (1982), durchgeführt. Die Zielzellen (ca. 10⁴ pro Vertiefung) wurden auf (96)-Mikroplatten (Flow Lab., Meckenheim) in HCM/10% FBS ausgesät und 24-48 Stunden im offenen System bebrütet. Die Monolayer-Kulturen wurden einmal mit PBS-A gewaschen und entweder 20 min mit einer PBS-A/0,5%igen Glutaraldehydlösung (Serva, Heidelberg, Nr. 23115) oder 5 min mit 4°C kaltem Methanol/Aceton (1:1) fixiert.

Nach erneutem Waschen mit PBS-A wurden unspezifische Proteinbindungsstellen der Platten mit PBS-A/10% Schweineserum für 60 min abgesättigt und die Platten entweder gleich benutzt oder bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

Vor dem Test wurde das Schweineserum dekantiert und pro Vertiefung 50 µl des jeweiligen, unverdünnten Kulturüberstandes aus den Fusions- oder Klonierungsplatten mittels einer Titertek-Multichannel-Pipette (Flow Lab., Meckenheim, Nr. 77-859-00) einpipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1:1000 verdünntes Serum der jeweils zur Fusion immunisierten Maus und als Negativkontrolle wurde Überstand der Myelomzellen verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-A/1% FBS wurden pro Vertiefung 50 µl des 1:100 in PBS-A/5% FBS verdünnten, Peroxidase-konjugierten, zweiten Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus-Ig, Dakopatts, Hamburg, Nr. P-260) einpipettiert, erneut 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-A/1% FBS und dreimal mit reinem PBS-A gewaschen. Um die Reaktion sichtbar zu machen, wurden je 100 µl von folgendem Substrat zugesetzt: 10 mg ortho-Phenyldiamin (Sigma, Deisenhofen, Nr. P-1526) gelöst in 10 ml 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5), welchem unmittelbar vor Gebrauch 4 µl einer 30%igen H₂O₂-Lösung (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Nr. 822287) zugefügt wurden.

Die Farbstoffintensität wurde immer nach 15 min im Photometer (Titertek, Multiskan^R MC, Flow Lab., Meckenheim) bei 492 nm gemessen. Als Leerwertkontrollen dienten Vertiefungen, deren Zellen nur mit Substrat inkubiert worden waren. Die Überstände wurden dann als positiv angesehen, wenn ihre Extinktionen den doppelten Leerwert übertrafen.

4.2 Indirekte Immunperoxidasefärbung (Zellen)

Um das Bindungsmuster der mAk an den verschiedenen Zielzellen sichtbar zu machen, wurden ELISA-positive Überstände in der indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) nach den Angaben von PATERAKI et al. (1981) auf (60)-Terasakiplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark, Nr. 1-63118) getestet.

10³ Zielzellen wurden pro Vertiefung ausgesät, nach 24 Stunden Bebrütung im offenen System als semikonfluenten Monolayer einmal mit PBS-A

gewaschen, 5 min mit 4°C kaltem Methanol/Aceton (1:1) fixiert und anschließend mindestens 10 min luftgetrocknet.

Je 20 µl des zu testenden Kulturüberstandes wurden pro Vertiefung im Doppelansatz einpipettiert und die Platten 60 min bei 37°C inkubiert. Nach sechs Waschvorgängen mit PBS-A wurden 20 µl vom zweiten Antikörper, einem Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, Nr. P-260), 1:100 in PBS-A/5% FBS verdünnt, in jede Vertiefung gegeben und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen mit PBS-A wurde zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion ein Substrat nach NEXØ (1977) verwendet: 20 mg 3-Amino-9-äthylcarbazol (AEC; Sigma, Deisenhofen, Nr. A-5754), gelöst in 5 ml N,N-Dimethylformamid (DMFA; Merck, Darmstadt, Nr. 3034), wurden mit 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) ad 100 ml aufgefüllt, filtriert und unmittelbar vor Gebrauch mit 50 µl einer 30%igen H₂O₂-Lösung (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) versetzt.

Die Platten wurden mit dem Substrat überschichtet und nach 10 min wurde die Farbreaktion durch vorsichtiges Spülen mit Aqua bidest. gestoppt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (inverses Kameramikroskop ICM 405, Zeiss, Oberkochen), wobei vier Intensitätsgrade unterschieden wurden: (a) negativ (-), (b) schwach positiv (+), (c) positiv (++) und (d) stark positiv (+++).

Positiv- und Negativkontrollen wurden bei jeder Färbung, wie beim mikro-ELISA unter 4.1 beschrieben, durchgeführt.

Bei späteren Fusionen wurden beide Möglichkeiten, gliombindende Antikörper nachzuweisen (mikro-ELISA und IPF), kombiniert: Die Zielzellen wurden, wie beim mikro-ELISA, mit erstem (mAk) und zweitem (Peroxidase-konjugierten) Antikörper inkubiert und anschließend das AEC-Substrat nach NEXØ verwendet. So konnten durch mikroskopische Auswertung sofort Bindungsart und -intensität der monoklonalen Antikörper beurteilt werden. Des weiteren wurden die Zielzellen unfixiert gefärbt, um das Bindungsmuster der mAk auf lebenden Zellen darzustellen. Dabei wurden sämtliche Färbeschritte und Inkubationszeiten, wie oben ausgeführt, beibehalten. Es diente jedoch nicht PBS-A als Verdünnungs- und Waschpuffer, sondern PBS, d.h. Phosphat-gepufferte Saline, die auch Ca- und Mg-Ionen enthielt, um ein Ablösen der nativen Zellen zu vermeiden.

5. Untersuchung der Spezifität selektierter Hybridomprodukte

5.1 Indirekte Immunperoxidasefärbung (Kryostatschnitte)

Um die Spezifität gliombindender Antikörper zu testen, wurde die IPF auf Kryostatschnitten von Hirntumoren sowie normalem Hirngewebe durchgeführt. Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden, fanden sämtliche Inkubationsschritte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt. Die Schnitte wurden entweder nativ oder nach 10 min Fixierung in 4°C kaltem Aceton wie folgt gefärbt:

- Schnitte 20 min baden in 20 ml Methanol + 5 ml 3%ige H_2O_2 -Lösung, um die endogene Peroxidase zu blockieren
- 3 x 10 min in PBS-A waschen
- 90 min mit 10%igem Kaninchenserum in PBS-A inkubieren
- 120 min mit 1. Antikörper (unverdünnter Kulturüberstand) inkubieren
- 4 x 10 min in PBS-A waschen
- 75 min inkubieren mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, Nr. P-260), 1:100 in PBS-A/1% FBS verdünnt
- 4 x 10 min in PBS-A waschen
- 20 min inkubieren mit AEC-Substrat nach NEXØ (1977): 10 mg AEC (Sigma, Deisenhofen) in 4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) lösen, mit 0,1 M Barbitallpuffer (pH 7,4; Merck, Darmstadt, Nr. 6318) ad 100 ml auffüllen, filtrieren und kurz vor Gebrauch mit 50 µl einer 30%igen H_2O_2 -Lösung versetzen.
- kurz in PBS-A spülen
- 2 min Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 9249)
- 10 min unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser bläuen
- Einschließen in Kaisers Glyceringelatine (Merck Darmstadt, Nr. 9242)
- am nächsten Tag das Deckglas mit Klarsichtlack abdichten.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, analog zur IPF auf Zellen, wobei neben der Intensität auch die Anzahl der gefärbten Zellen berücksichtigt wurde: (a) negativ (-), (b) einige positive Zellen (+), (c) weniger als 50% der Zellen positiv (++), (d) mehr als 50% der Zellen positiv (+++).

5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Gliomzellen wurden mit einer STV-Lösung von den Kulturgefäßen abtrypsiniert, in 10 ml HCM/10% FBS suspendiert, 5 min bei 200 x g zentrifugiert, gezählt und mit HCM/10% FBS auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 µl 5 min bei 150 x g auf Objektträger zentrifugiert (Cytocentrifuge, Shandon), 24 Stunden luftgetrocknet und nativ oder nach Fixierung mit 4°C kaltem Methanol/Aceton (1:1) bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren.

Zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Cytospin-Präparate kurz in PBS-A gespült, mit 100 µl des zu untersuchenden Hybridomüberstandes (1. Antikörper) für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und wieder mit PBS-A gewaschen (3 x 5 min). Als 2. Antikörper wurde Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, Nr. F-261), 1:10 in PBS-A/1% FBS verdünnt, verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min in einer feuchten Kammer wurde erneut 3 x 5 min mit PBS-A gewaschen.

Die Präparate wurden in Glycerin (Merck, Darmstadt, Nr. 4095), mit 10% PBS-A gepuffert, eingeschlossen und konnten bei 4°C lichtgeschützt bis zu zwei Wochen gelagert werden.

6. Anreicherung von monoklonalen Antikörpern

6.1 Anreicherung in vitro durch serumfreien Kulturüberstand

Zur Gewinnung von serumfreien Hybridomüberständen wurden die Zellen aus 4-6 dichtgewachsenen (24)-Linbroplatten-Vertiefungen (Greiner, Nürtingen) in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 200 x g abzentrifugiert, mit serumfreien Hybridomerhaltungsmedium (FEB-100 Medium; Biochrom, Berlin, Nr. F-8015) resuspendiert und in 260 ml Plastikflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) verbracht. In diesem Medium zeigten die verschiedenen Klone ohne "feeder-layer"-Zellen für mindestens 7 Tage sehr gutes Wachstum, wobei die Antikörperproduktion voll erhalten blieb. Nach 2-3 Wochen waren die Hybridome abgestorben und die Zelltrümmer wurden 10 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der antikörper-

haltige Überstand wurde gesammelt und konnte ohne wesentlichen Aktivitätsverlust bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden. In der Regel wurde allerdings der Kulturüberstand mit Ammoniumsulfat präzipitiert oder direkt durch Vakuumfiltration (Agitator CX, mit Rührereinheit; Millipore, Eschborn) mit Eintauchfiltern (Immersible CX-30, Millipore, Eschborn) konzentriert und bei -20°C in 500 µl Portionen eingefroren.

6.2 Anreicherung in vivo durch Aszitesproduktion

6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan^R; Aldrich-Chemie, Steinheim, Nr. T2,280-2) i.p. vorbehandelt (McKEARN, 1980) und erhielten nach 2-3 Wochen 10⁷ Hybridomzellen, suspendiert in 1 ml PBS-A, i.p. transplantiert. Nach ca. 7 Tagen zeigte bei den ersten Tieren eine charakteristische birnenförmige Auftreibung des Abdomens die Aszitesproduktion an. Die Tiere wurden in Äthernarkose getötet und nach Eröffnung der Bauchhöhle konnten mit einer Pasteurpipette 3-7 ml der antikörperreichen Aszitesflüssigkeit gewonnen werden. Darin enthaltene Zellen wurden 10 min bei 200 x g abzentrifugiert und der dekantierte Überstand zur Fibringerinnung eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach erneuter Zentrifugation (20 min bei 1000 x g) wurde das flotierende Pristan^R abgesaugt und die klare, zellfreie Aszitesflüssigkeit bis zu ihrer Verwendung bzw. Reinigung in 500 µl Portionen bei -20°C eingefroren.

7. Gewinnung monoklonaler Antikörper

7.1 Ammoniumsulfatpräzipitation

Um IgG-Antikörper aus größeren Mengen Kulturüberstand oder Aszitesflüssigkeit zu isolieren, wurde die Ammoniumsulfatpräzipitation nach den Angaben von JONAK (1980) in leicht modifizierter Form durchgeführt.

Eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung (1000 g (NH₄)₂SO₄ gelöst in 1000 ml Aqua dest., pH mit 8 M NaOH auf 7,0-7,1 eingestellt) wurde langsam, unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer, in die jeweilige Probe

gegeben, bis eine Endkonzentration von 50% erreicht war. Anschließend wurde das Gemisch 1 Stunde bei 4°C aufbewahrt. Das Präzipitat wurde 30 min bei 4000 x g (GODING, 1986) und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Sediment in einer geringen Menge Aqua dest. – je nach gewünschtem Einengungsgrad – gelöst, in einen Dialyse-Schlauch (Roth, Karlsruhe, Visking O-1782, Typ 20/32) verbracht und unter mehrmaligem Pufferwechsel 48 Stunden gegen PBS-A dialysiert.

Die Immunglobulinkonzentration im Dialysat wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm in einem Spektralphotometer (PMQ 3, Zeiss, Oberkochen) nach folgender Formel errechnet (GODING, 1986):

$$\text{IgG (mg/ml)} = (A_{280}) : 1,4$$

7.2 Protein-A-Sepharose-Affinitätschromatographie

Die IgG-Subklassen der präzipitierten Aszitesflüssigkeit konnten affinitätschromatographisch über eine Protein-A-Sepharose-Säule nach den Angaben der Firma Pharmacia (1986) isoliert werden. Sämtliche Puffer wurden mit Reagenzien von Merck (Darmstadt) angesetzt und vor ihrer Verwendung 30 min auf einem Magnetrührer mit einer Vakuumsaugflasche entgast. Die Durchflußrate der Säule wurde konstant bei 0,8 ml/min gehalten.

1,5 g Protein-A-Sepharose (CL-4B; Pharmacia, Freiburg, Nr. 17-0780-01) wurden in 10 ml Bindungspuffer (1,5 M Glycin, 3 M NaCl, pH mit 5 M NaOH auf 8,9 eingestellt) suspendiert und nach einer Quellzeit von 30 min vorsichtig in eine 10 ml Einmalspritze gefüllt. Nachdem die Säule mit 20 ml des gleichen Puffers equilibriert worden war, wurde 1 ml der präzipitierten Aszitesflüssigkeit mit 1 ml Bindungspuffer gemischt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde so lange mit dem Glycin/NaCl-Puffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluates im Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen) bei 280 nm unter 0,05 lag. Die Eignung dieses Bindungspuffers wurde mit dem 0,14 M Phosphatpuffer nach EY et al. (1978) verglichen.

Als Elutionspuffer für die verschiedenen IgG-Subklassen diente 0,1 M Citronensäure, die mit 5 M NaOH auf pH 6,0 (IgG1), pH 5,0 (IgG2a), pH

4,0 (IgG2b und IgG3) und pH 3,0 (Regenerationspuffer) eingestellt wurde. Es wurden jeweils so lange Fraktionen à 1 ml gesammelt, bis der Extinktionswert bei A_{280} weniger als 0,05 betrug. Die Fraktionen wurden in 0,2 M Natriumhydrogencarbonatlösung (0,5 ml für IgG1, 1 ml für IgG2a oder 1,5 ml für IgG2b bzw IgG3) aufgefangen, um den sauren Puffer sofort zu neutralisieren und eine mögliche Proteindenaturierung zu vermeiden.

Fraktionen mit hohem Immunglobulingehalt wurden gepoolt und unter Vakuumfiltration (Agitator CX; Millipore, Eschborn) konzentriert, wobei der Eintauchfilter eine Ausschlußgrenze von 30 kd hatte. Die eingeeengte Probe wurde in einen Dialyseschlauch verbracht und 48 Stunden unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen PBS-A dialysiert.

Nach Absorptionsmessung im Photometer wurde die Antikörperkonzentration auf 1-5 mg/ml PBS-A eingestellt, die Proben steril filtriert (Flow Pore D, Flow Lab., Meckenheim, Nr. 64-001-04) und in 100 µl Portionen bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

8. Bestimmung der Immunglobulinisotypen

8.1 Agargel-Immunodiffusion

Für die doppelte Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (1962) wurden in das zentrale Loch einer Immunodiffusionsplatte (Miles Scientific/Bayer Diagnostik, München, Nr. 642761) 20 µl des zu bestimmenden, serumfreien, konzentrierten Hybridomüberstandes (ca. 100 µg Ig/ml) einpipetiert. Die sechs peripheren Löcher wurden mit je 20 µl eines Kaninchen-anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM und -IgA (Miles Scientific, Naperville, USA, Nr. 643601, 643611, 643621, 643631, 643651 und 643641) beschickt, der Vorgang nach zwei Stunden wiederholt und die Platten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 48 Stunden war eine deutliche Präzipitationslinie zwischen dem zentralen und einem korrespondierenden Antiserum-haltigen Loch zu erkennen.

8.2 ELISA-Verfahren

Dieser Test wurde mit dem Mouse Typer Sub-Isotyping Kit (Bio-Rad, München, Nr. 172-2051) durchgeführt. Die Testplatten wurden mit den Zielzellen (86HG-39), wie beim mikro-ELISA unter 4.1 beschrieben, vorbereitet.

Als 1. Antikörper diente serumfreier, unverdünnter Überstand der verschiedenen Hybridomklone (100 µl/Vertiefung), der jeweils im Doppelsatz eingefüllt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 60 min bei 37°C wurde dreimal mit PBS-A/0,05% Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Nr. 822184) gewaschen und anschließend je 100 µl Kaninchen-anti-Maus-IgG1 bzw. -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM oder -IgA einpipettiert. Nach erneuter 60 minütiger Inkubation bei 37°C und fünfmaligem Waschen mit PBS-A/Tween wurden sämtliche Vertiefungen mit je 100 µl Peroxidase-konjugiertem 3. Antikörper (Ziegen-anti-Kaninchen-Ig), 1:3000 in PBS-A/Tween verdünnt, beschickt und wieder 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einer letzten Waschprozedur (4 x PBS-A/Tween, 2 x PBS-A) wurden je 100 µl folgenden Substrates (GALLATI und PRACHT, 1985) einpipettiert:

- Stammlösung I: H₂O₂-Pufferlösung: 0,21 M Kaliumcitrat (pH 3,9-4,0) und 3,15 mM H₂O₂, d.h. 44,12 g Citronensäure Monohydrat (Merck, Darmstadt) in 800 ml Aqua dest. lösen und 200 ml 1 M KOH sowie 360 µl 30%ige H₂O₂-Lösung (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) zufügen. Lichtgeschützt war diese Lösung bei Raumtemperatur einige Wochen haltbar.
- Stammlösung II: 21 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung (TMB; Sigma, Deisenhofen, Nr. T-2885), d.h. 252 mg TMB (MG: 240,35) in 5 ml Aceton lösen und 45 ml Methanol zufügen. Auch diese Lösung war lichtgeschützt bei Raumtemperatur einige Wochen haltbar.

Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Substratlösung wurden 20 Volumenteile von Stammlösung I mit 1 Volumenteil der Stammlösung II vermischt; diese war bei Raumtemperatur jedoch nur 2-3 Stunden haltbar. Nach 15 min Inkubation wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte, und im ELISA-reader bei 450 nm photometrisch gemessen.

9. Darstellung von GAA mittels monoklonaler Antikörper (Western-Blot)

9.1 Präparation von Membranantigenen

Membranantigene mußten erst in eine wasserlösliche Form überführt werden, bevor sie analysiert werden konnten.

Die bei -80°C tiefgefrorenen Gliomzellen (je 10^8 85HG-63- und 86HG-39-Zellen) wurden während 3 min im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugenglas überführt und dreimal 5 min bei $200 \times g$ in PBS-A/0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma, Deisenhofen, Nr. P-7626) gewaschen. Das Lysieren der Tumorzellen erfolgte nach der Methode von TOBIN (1987) durch dreimaliges Einfrieren (Zentrifugenröhrchen für 60 min in -20°C kalte 0,2 M BaCl_2 -Lösung stellen) und Auftauen (Wasserbad 37°C). Diese Suspension wurde in einem Homogenisator (Potter S, Braun, Melsungen) bei 1000 U/min homogenisiert und 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert, um Zellkerne und unlysierte Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde erneut homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt, in einer Ultrazentrifuge L5.50 (Beckman, München) für 30 min bei $25000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und das Pellet resuspendiert in 2 ml Lysereagenz, bestehend aus 100 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,8) mit 1 g Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma, Deisenhofen, Nr. L-4509), 818 mg NaCl (Merck, Darmstadt, Nr. 6404), 0,1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 20,3 mg MgCl_2 (Merck, Darmstadt, Nr. 5833) und 10 mg NaN_3 (Serva, Heidelberg, Nr. 30175). Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Membranpräparation wurde die Absorption in einem Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen) bei 280 nm gemessen. Er betrug durchschnittlich $4,25 \text{ mg}/10^8$ Zellen, und die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung in Portionen zu je 100 μl bei -20°C eingefroren.

9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE mit einem Konzentrationsgradienten von 4-15% konnten die Bestandteile der Membranpräparation nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu wurden 8,8 ml einer 15%igen Polyacrylamidlösung: 3,30 ml Acrylamid 40% (Serva, Heidelberg, Nr. 10674)

2,75 ml Gelpuffer (0,4 g SDS in 100 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8)

2,75 ml Aqua dest.

mit 12 ml einer 4%igen Polyacrylamidlösung:

1,20 ml Acrylamid 40%

3,00 ml Gelpuffer

5,00 ml Glycerin (Serva, Heidelberg, Nr. 23175)

1,00 ml 0,01 %ige Bromphenolblaulösung (Merck, Nr. 8122)

1,80 ml Aqua dest.

im Gradientenmischgerät vermischt und in die Gießkassette (11 x 16 cm, Geldicke 1,2 mm) gefüllt, wobei das Gel auf die hydrophobe Seite einer Trägerfolie (GelBond PAG Film, LKB, Bromma, Schweden) aufgetragen wurde.

Als Molekulargewichtstandard dienten vorgefärbte Markerproteine (Sigma, Deisenhofen, Nr. SDS-7B) mit definierten Molekulargewichten von 26,6 kd, 36,5 kd, 48,5 kd, 58 kd, 84 kd, 116 kd und 180 kd. Je 50 µl der Membranproben wurden 1:1 mit Probenpuffer (1% SDS in 10%igem Gelpuffer) versetzt und 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Jeweils eine Probe wurde mit 5%igem 2-Mercaptoäthanol (Sigma, Deisenhofen, Nr. M-6250) reduziert, wodurch Disulfidgruppen alkyliert wurden.

In die 8 Probeslots wurden je 100 µl gefüllt, die Elektrophorese (60mA max., 1000 V max., 25 W max.) gestartet und nach ca. 90 min (Bromphenolblau-Front am unteren Gelrand) beendet.

9.3 Western-Blot

Der Transfer der Makromoleküle, nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung im Gel, auf eine immobilisierende Nitrozellulosemembran (BA 85 Membranfilter, 0,45 µm dick, Schleicher und Schoell, Dassel) wurde nach den Angaben von TOWBIN et al. (1979) und KYHSE-ANDERSON (1985) durchgeführt.

Dazu diente ein Semi-dry Elektrobloetter (Sartorius, Göttingen), dessen Graphit-Elektroden zunächst mit Aqua dest. gespült wurden. Vier Lagen Filterpapier (Whatmann 3; Schleicher und Schoell, Dassel) wurden in Anodenpuffer I (0,3 M Tris in 20%igem Methanol) getränkt und auf die Graphit-Anode gelegt. Darauf kamen zwei Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II (25 mM Tris in 20%igem Methanol) und die in Aqua dest. getauchte Nitrozellulosemembran. Auf letztere wurde das Gel von der Trägerfolie vorsichtig abgerollt und darauf folgten 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer (25 mM Tris und 40 mM Aminoca-

pronsäure (Merck, Darmstadt, Nr. 800145) in 20%igem Methanol). Die mit Aqua dest. gespülte Graphit-Kathode wurde aufgelegt und zwei Stunden konnten die elektrophoretisch aufgetrennten Makromoleküle bei 150 mA an die Membran adsorbieren.

Danach wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und 30 min in PBS-A/4% Magermilchpulver (Glücksklee, Hamburg) gewaschen, um unbesetzte Proteinbindungsstellen abzusättigen und so eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern.

9.4 Immunchemischer Nachweis von GAA und Molekulargewichtsbestimmung

Um die korrespondierenden Antigenstrukturen zu den jeweiligen monoklonalen Antikörpern darzustellen, wurde die Nitrozellulosemembran nach folgendem Verfahren gefärbt:

- 1 min in PBS-A/0,05% Tween 20 waschen
- serumfreier Hybridomüberstand (1. Antikörper), 1:10 in PBS-A/Tween verdünnt, 60 min in feuchter Kammer inkubieren
- 3 x 5 min in PBS-A/Tween waschen
- Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, Nr. P-260), 1:50 in PBS-A/Tween verdünnt (2. Antikörper), 60 min in feuchter Kammer inkubieren
- 3 x 5 min in PBS-A/Tween waschen
- 1 min in 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) waschen
- 10 min mit folgendem Substrat inkubieren: 20 mg AEC (Sigma, Deisenhofen), gelöst in 5 ml DMFA (Merck, Darmstadt), mit 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) ad 100 ml, filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch mit 50 µl einer 30%igen H_2O_2 -Lösung (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) versetzen.

Die Reaktion wurde durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt, die Membranstreifen zwischen Filterpapier getrocknet und lichtgeschützt gelagert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde für die Markerproteine auf halb-logarithmischem Papier eine Eichgerade gezeichnet. Dazu wurden die Wanderungsstrecken der einzelnen Banden gemessen und auf die Abszisse aufgetragen. Das entsprechende Molekulargewicht wurde auf der Ordinate markiert und die Punkte zu einer Geraden verbunden. Die Wanderungsstrecken der AEC-gefärbten Probenbanden wurden gemessen und das korrespondierende Molekulargewicht konnte durch die Eichgerade gefunden werden.

10. Konjugation von MUC 2-63 an Daunomycin

10.1 Konjugationsprotokoll

Die Konjugation von MUC 2-63 an Daunomycin (DM) wurde nach den Angaben von GALLEGO et al. (1984) durchgeführt.

5 mg Daunomycinhydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, Nr. D-4885) wurden in 1 ml Aqua dest. gelöst und im Eisbad der pH mit 0,1 M NaOH auf 8,5 eingestellt. Unter Beibehaltung dieses pH wurden 5 mg cis-Aconitsäureanhydrid (Sigma, Deisenhofen, Nr. A-3413) langsam dazugegeben. Nach 5 min Inkubation (Eisbad) wurde 1 M HCl bis zur Niederschlagsbildung vorsichtig eingetropft. Das Gemisch wurde 5 min bei 800 x g zentrifugiert, das Präzipitat in 1 ml Aqua dest. gelöst und so lange mit 0,1 M NaOH versetzt, bis die Lösung wieder klar war. Nach nochmaliger Fällung mit 1 M HCl wurde der Niederschlag in 0,5 ml PBS-A (pH 7,3) resuspendiert.

Die Reinheit des Reaktionsproduktes wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt, Nr. 5628) überprüft. Als Laufmittel diente Chloroform/Äthanol/Essigsäure (70/20/15). Der Rf ("ratio front") - Wert des Reaktionsproduktes betrug 0,62, der des freien Daunomycins 0,27.

Zum Daunomycin-Aconitsäureanhydrid wurde der mAk (serumfreier, mit Ammoniumsulfat präzipitierter Überstand von MUC 2-63, 15 mg/ml PBS-A) in 25-fachem molaren Überschuß gegeben. Nach Hinzufügung von 50-fachem molaren Überschuß an 1-Äthyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimidhydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, Nr. E-6383) wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

2 g Sephadex G-25/fine (Pharmacia, Freiburg, Nr. 17-0032-01) wurden in 20 ml entgastem PBS-A vier Stunden gequollen und vorsichtig in eine 10 ml Einmalspritze gefüllt. Die Gelsäule wurde mit weiteren 20 ml PBS-A equilibriert und die Probe aufgetragen. Aufgrund der geringen Porengröße wurde unkonjugiertes Daunomycin (MG: 564,0) noch zurückgehalten, während der konjugierte Antikörper sofort eluiert werden konnte.

Bei einer konstanten Durchflußrate von 0,8 ml/min wurden jeweils Fraktionen zu 1 ml gesammelt und der Proteingehalt durch Messung im Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen) bei 280 nm bestimmt.

Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels DC auf Verunreinigungen mit unkonjugiertem DM geprüft und anschließend gepoolt. Das Konjugat wurde im Agitator CX (Millipore, Eschborn) mit Eintauchfilter (Ausschlußgrenze 30 kd) konzentriert und bis zu seiner Verwendung in 100 µl Portionen bei -20°C gelagert.

10.2 Quantitative Zusammensetzung des Konjugates

Um für Zytotoxizitätsexperimente die quantitative Zusammensetzung des Konjugates abschätzen zu können, wurden folgende photometrischen Messungen durchgeführt:

Zur Feststellung des Proteingehaltes im Konjugat wurde dieses 1:10 mit PBS-A verdünnt und zunächst die Absorption des gekoppelten Daunomycins bei 495 nm gegen PBS-A gemessen,

Unkonjugiertes DM wurde auf die gleiche Konzentration eingestellt und diente seinerseits als Leerwert für die Proteinmessung des Konjugates bei 280 nm.

Bei einem molaren Extinktionskoeffizient $\epsilon = 10000$ für DM konnte jetzt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

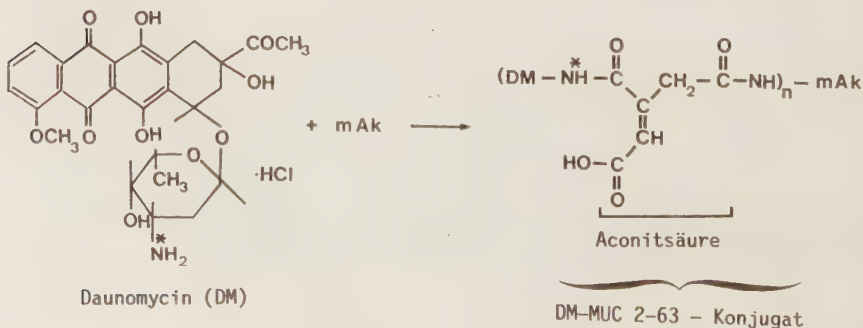
$$E = \epsilon \times c \times d$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient bei λ

c = molare Konzentration der Lösung

d = Schichtdicke 1 cm

die Anzahl der gebundenen Moleküle DM pro Molekül Antikörper errechnet werden.



10.3 Nachweis der Bindungsfähigkeit des konjugierten Antikörpers mittels IPF

Eine Konjugation von mAk und zytotoxischen Substanzen kann nur dann als erfolgreich bezeichnet werden, wenn die Eigenschaften beider Ausgangsmoleküle erhalten bleiben. Um das Bindungsverhalten des DM-gekoppelten MUC 2-63 zu überprüfen, wurde eine IPF auf (96)-Mikroplatten (Flow Lab., Meckenheim) durchgeführt.

Die Platten wurden dazu mit Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41_{CG} (nativ und Methanol/Aceton-fixiert), wie beim mikro-ELISA unter 4.1 beschrieben, vorbereitet.

Vom Konjugat wurden verschiedene Verdünnungen angelegt (200 µg Ig/ml, 50 µg Ig/ml, 25 µg Ig/ml, 12,5 µg Ig/ml und 6,25 µg Ig/ml) und als Kontrollen dienten serumfreier Kulturüberstand und Aszites von MUC 2-63 (jeweils Ammoniumsulfat-präzipitiert) in den gleichen Verdünnungsstufen.

Die Färbung erfolgte wie beim mikro-ELISA beschrieben und als Substrat diente AEC (Sigma, Deisenhofen), in der gleichen Zusammensetzung wie bei der IPF von Zellen (4.2).

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, wobei das Bindungsmuster des konjugierten Antikörpers mit dem der Kontrollen in gleicher Proteinkonzentration verglichen wurde.

11. Mikrozytotoxizitätstest

Zur Überprüfung der natürlichen oder Komplement-vermittelten Zytotoxizität von nativem MUC 2-63 wurde der Mikrozytotoxizitätstest nach den Angaben von KENNETT (1980b) in (60)-Terasakiplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt.

10³ Zielzellen (85HG-63) wurden pro Vertiefung ausgesät und mit HCM/10% FBS 24 Stunden im offenen System bei 37°C bebrütet. Das Medium wurde abgesaugt und die Platten einmal mit PBS-A/1% FBS gewaschen. Als Antikörper diente präzipitierte und affinitätschromatographisch gereinigte Aszitesflüssigkeit von BALB/c-Mäusen, denen der Hybridomklon MUC 2-63 i.p. transplantiert worden war. Dieser wurde mit HCM auf eine

Konzentration von 20 µg Ig/ml eingestellt und nach Dekomplementierung (30 min bei 56°C) war seine Bindungsfähigkeit an Gliomzellen mittels IPF überprüft worden. Als Kontrolle diente Überstand von den Myelomzellen X63-Ag8.653. Es wurden jeweils 20 µl pro Vertiefung einpipetiert und 30 min bei 37°C inkubiert.

Als Komplementquelle diente lyophilisiertes Meerschweinchenserum (Gibco, Karlsruhe, Nr. 065-9190), welches in 0,44 M Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Nr. 6267) und 0,32 M Borsäure (Merck, Darmstadt, Nr. 165) rehydriert und mit HCM/10 % FBS 1:10 und 1:20 verdünnt wurde. In einen Teil der Vertiefungen wurden je 5 µl der Komplementverdünnungen einpipettiert und 60 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde jede Vertiefung mit 5 µl einer PBS/0,4%igen Trypanblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 11732) versetzt und nach 10 min Inkubationszeit (RT) konnte der Test mikroskopisch (inverses Kameramikroskop ICM 405, Zeiss, Oberkochen) ausgewertet werden. Dazu wurden pro Vertiefung 100 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der lebenden bestimmt.

Lebende Zellen waren aufgrund ihrer intakten Zellmembranen hell, während der Farbstoff in tote Zellen eindringen konnte und diese sich deutlich blau darstellten.

12. Effekt von Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 in vitro

12.1 Proliferationshemmung der Zielzellen

Zellen der Gliomlinie 85HG-63 humanen Ursprungs und der Rattengliomlinie 79FR-G-41_{C8} wurden aus ihren Kulturgefäßen abtrypsiniert, zentrifugiert und in frischem HCM/10% FBS resuspendiert, wobei sie auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml HCM eingestellt wurden. Von der Zellsuspension wurden je 10⁵ Zellen (100 µl) pro Vertiefung einer (24)-Linbroplatte (Greiner, Nürtingen) ausgesät und mit Nährmedium für 24 Stunden im offenen System bebrütet.

Danach wurden die Zellen mit frischem HCM/10% FBS bzw. mit Medium, das folgende Zusätze enthielt, inkubiert: serumfreier, präzipitierter und affinitätschromatographisch gereinigter Kulturüberstand von MUC 2-63 (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml), DM-konjugierter MUC 2-63 mit analogen Proteingehalten oder freies DM in der gleichen

Konzentration wie im Konjugat (8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,2 µg/ml).

Sämtliche Ansätze wurden vierfach durchgeführt, wobei jeweils bei der Hälfte nach einer Stunde das Medium gewechselt wurde. Nach drei Tagen Inkubation im offenen System wurden die Zellen der Doppelansätze abtrypsiniert und im Coulter Counter gezählt.

12.2 Vitalitäts- bzw. Aktivitätsbestimmung (MTT-Test)

Zur Aktivitätsbestimmung der Zellen wurde der MTT-Test nach den Angaben von PETERS et al. (1985) durchgeführt.

Der gelbe Vitalfarbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT; Sigma, Deisenhofen, Nr. M-2128) wurde nur von lebenden Zellen aufgenommen und durch mitochondriale Dehydrogenasen zu intensiv blauen, wasserunlöslichen Farbstoffkristallen umgesetzt, welche zur photometrischen Messung mit Isopropanol aufgelöst werden konnten. Die Intensität der Blaufärbung stand dabei in direktem Zusammenhang mit der Zellzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen (MOSMANN, 1983).

Je 10^4 Zellen der humanen Gliomlinie 85HG-63 bzw. der Rattengliomzelllinie 79FR-G-41_{CG} wurden pro Vertiefung einer (96)-Mikroplatte (Flow Lab., Meckenheim) ausgesät und für 24 Stunden im offenen System bei 37°C bebrütet.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem HCM/10% FBS bzw. nativem MUC 2-63, DM-gekoppeltem MUC 2-63 oder freiem DM, in gleicher Konzentration wie unter 12.1 beschrieben, im offenen System inkubiert. Pro Ansatz wurden zwei Reihen zu je 8 Vertiefungen angelegt, wobei jeweils bei einer Reihe nach einer Stunde das Medium gewechselt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen im offenen System wurden die Platten dekantiert und 100 µl PBS in jede Vertiefung gefüllt. Von einer 12 mM MTT-Stammlösung (Lagerung: sterilfiltriert bei -20°C) wurden 10 µl pro Vertiefung einpipettiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Platten wurden dekantiert und nach Zugabe von je 20 µl einer einprozentigen SDS-Lösung (Sigma, Deisenhofen) wurden 100 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt, Nr. 9634) pro Vertiefung eingefüllt, sofort bei 620 nm photometriert (Titertek Multiskan^R MC, Flow Lab., Meckenheim) und jeweils die durchschnittliche Extinktion berechnet.

13. Bindungsverhalten von MUC 8-22 und MUC 2-63 in vivo

13.1 Transplantationstumoren

4-6 Wochen alten BALB/c-nu/nu- bzw. NMRI-nu/nu-Mäusen wurden jeweils 10^7 Gliomzellen der Zelllinie 85HG-66-T6 (in 0,3 ml PBS-A oder HCM) subkutan (s.c.) im Bereich der rechten Brustwand injiziert. Nach 6-8 Wochen entstanden an der Inokulationsstelle bohngroße, verschiebliche, solide Tumoren und die Tiere konnten für die Versuche verwendet werden.

13.2 Markierung der Antikörper mit Jod- 131 *

Um das Bindungsverhalten der mAk MUC 8-22 und MUC 2-63 in vivo zu untersuchen, wurden diese mit der Jodogen-Methode nach FRAKER und SPECK (1978) radioaktiv markiert.

1,5 ml Eppendorfgefäße wurden mit je 5 µg Jodogen (Pierce Chem., Rotterdamm) beschichtet und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Markierung wurden 500 µl Antikörperlösung (0,5 mg/ml PBS-A, serumfreier, präzipitierter Kulturüberstand) mit 100 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,4) in die beschichteten Gefäße einpipettiert und mit 50 µl/ $2\text{mCi } ^{131}\text{NaJ}$ (74 MBq, Amersham Int., München) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-25/fine Säule (Pharmacia, Freiburg) von freiem Jod gereinigt. Die Elution erfolgte mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und die Aktivität der Fraktionen (jeweils 0,5 ml) wurde im Bohrlochszintillationsdetektor (Gammazint BF 5300, Berthold) gemessen. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 50 MBq markierter Antikörper in einem Volumen von 3 ml.

* Die radiologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau S. Möllenstädt, Abt. für Nuklearbiologie (Prof. Dr. H. Kriegel) der GSF, München, durchgeführt.

13.3 Externe Szintigraphie

Zur Darstellung des in vivo Bindungsverhaltens erhielten die Tiere ca. 30 µg markierten Antikörper (MUC 8-22 bzw. MUC 2-63) mit einer Aktivität von 200 µCi (7,4 MBq) in die Schwanzvene oder i.p. injiziert.

Eine weitere Gruppe wurde mit markiertem MUC 2-63 zweimal, im Abstand von drei Wochen, i.p. behandelt (jeweils ca. 45 µg mAk mit einer Aktivität von 300 µCi/11,1 MBq), während bei einer unbehandelten Kontrollgruppe, im gleichen Zeitraum, das Tumorstadium durch Messung mit einer Schublehre verfolgt wurde.

Dazu wurden die Tumoren in zwei Ebenen gemessen (a und b) und als Maß für die Tumorgroße (T) wurde die Wurzel aus dem Produkt der beiden Durchmesser gezogen:

$$T = \sqrt{a \times b}$$

Die szintigraphische Darstellung der in vivo Verteilung der markierten Antikörper erfolgte mit einer Gammakamera mit 2 mm Pinhole-Kollimator, computerunterstützter Auswertung und Datenspeicherung (Phillips MPS mit DEC PDP 11/34). Die Energieeinstellung der Kamera erfolgte auf dem 365 keV-peak für Jod-131 bei einem Fenster von 20%. Die auflaufenden Impulse wurden gezählt und nach 40000 counts wurde die Aufnahme automatisch beendet und die Daten in einem Digital Computer System auf einer 64 x 64 Matrix gespeichert.

Zur externen Szintigraphie wurden die Tiere mit 0,3 ml einer 1:1 Mischung aus Ketanest^R (100 mg/ml 0,9%ige NaCl-Lösung, Parke-Davis) und Rompun^R (5 mg/ml 0,9%ige NaCl-Lösung, Bayer) i.p. narkotisiert und bei ventro-dorsaler Projektion so gelegt, daß eine Maus das Gesichtsfeld des Szintillationskristalls gerade ausfüllte.

Die Scanning-Aufnahmen wurden meist 4, 8 und 12 Tage nach Applikation des markierten Antikörpers durchgeführt.

II. Ergebnisse

1. Produktion und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

1.1 Immunisierungs- und Fusionsprotokolle

Insgesamt wurden 12 Fusionsversuche zwischen sensibilisierten Splenocyten von BALB/c-Mäusen, die mit verschiedenen Gliomzellen (Operationsmaterial oder permanente Kulturen) bzw. embryonalen Hirnzellen hyperimmunisiert worden waren und Mausmyelomzellen (X63-Ag8,653) durchgeführt (Tab. 3).

Bei sämtlichen Fusionen wurde PEG als Fusionsvermittler verwendet und Mäuseperitonealzellen dienten als "feeder-layer". Die Anzahl der Fusionsplatten richtete sich nach der unterschiedlichen Ergiebigkeit der Milzzellpräparation, wobei für ca. 30×10^6 Milzzellen je eine (96)-Mikroplatte angelegt wurde.

1.2 Ausbeute an Hybridomen

Ab dem 4. Tag nach einer Fusion konnten in einzelnen Plattenvertiefungen typische Hybridomkolonien - runde bis birnenförmige, durchsichtig erscheinende Zellen, die traubenförmig zusammenlagen - gefunden werden. Nach 10-14 Tagen waren alle Myelomzellen in den HAT-Kontrollreihen zugrunde gegangen und wachsende Kolonien konnten als Hybridome angesprochen werden. Dabei war jedoch nicht festzustellen, ob diese aus einer oder mehreren verschmolzenen Zellen hervorgegangen waren. Die Kulturüberstände wurden auf Anwesenheit gliombindender Antikörper untersucht, sobald die einzelnen Vertiefungen zu 60-80% bewachsen waren (Tab. 4).

Der mikro-ELISA diente als erstes "screening"-Verfahren nach den Fusionen. ELISA-positive Überstände wurden mittels IPF auf (60)-Terasakiplatten getestet. Da jedoch im mikro-ELISA jede Vertiefung mit Koloniewachstum und einem Extinktionswert über dem der Myelomkontrollreihen als positiv angesehen werden mußte, und erst die IPF Aufschluß

Tabelle 3: Einzelheiten aus den Versuchsanordnungen bei den Fusionen 1-12

Fus. Nr.	Antigen	Tage und Modus der Grundimmunisierung	Tage und Modus der Boosterung	Tag der Fusion	Milz-zellen	Myelom-zellen	Milz-/Myelom-zellen	Anzahl der Fusionsplatten
1	N22/85	1 - 8 - 15 5x10 ⁶ TNBS ip	110 5x10 ⁵ nativ isp	113	105x10 ⁶	21x10 ⁶	5:1	3
2	85HG-59	1 - 8 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	147 4x10 ⁶ nativ ip 5x10 ⁵ nativ isp	150	100x10 ⁶	10x10 ⁶	10:1	3
3	85HG-63	1 - 8 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	90 4x10 ⁶ nativ ip	93	120x10 ⁶	12x10 ⁶	10:1	4
4	85HG-63	1 - 8 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	148 5x10 ⁶ nativ ip	151	90x10 ⁶	18x10 ⁶	5:1	3
5	85HG-64	1 - 14 - 23 1x10 ⁶ TNBS ip	91 4x10 ⁶ nativ ip	94	120x10 ⁶	12x10 ⁶	10:1	4
6	85HG-64	1 - 20 3x10 ⁶ TNBS ip	52 5x10 ⁶ nativ ip	55	95x10 ⁶	19x10 ⁶	5:1	3
7	85HG-65	1 - 8 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	152 6,5x10 ⁶ nativ ip	155	72x10 ⁶	14x10 ⁶	5:1	3
8	85HG-65	1 - 8 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	167 7x10 ⁶ nativ ip	170	90x10 ⁶	9x10 ⁶	10:1	3
9	85HG-65	1 - 15 2x10 ⁶ TNBS ip	51 5x10 ⁶ nativ ip	54	65x10 ⁶	13x10 ⁶	5:1	2
10	85HG-66-T6	1 - 10 - 22 1x10 ⁶ TNBS ip	142 4x10 ⁶ nativ ip	145	125x10 ⁶	13x10 ⁶	10:1	4
11	86HE-9	1 - 15 1x10 ⁶ TNBS ip	43 5x10 ⁵ nativ isp	46	137x10 ⁶	19x10 ⁶	7:1	4
12	86HG-39	1 - 8 - 15 2x10 ⁶ TNBS ip	91-92-93-94 8x10 ⁵ nativ ip	95	145x10 ⁶	15x10 ⁶	10:1	5

ip: intraperitoneal; isp: intrasplenal

über die Anwesenheit gliombindender Antikörper gab, wurde bei späteren Fusionen (10 und 12) das Testverfahren geändert. Sämtliche Kulturüberstände wurden sofort in der IPF auf (96)-Mikroplatten getestet, um die Bindungsfähigkeit der Antikörper direkt an den Zielzellen mittels AEC-Substrat sichtbar zu machen.

Tabelle 4: Anzahl der entstandenen und Antikörper produzierenden Hybridomkolonien bei den Fusionen 1-12

Fus. Nr.	Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum	Antikörperpositive Plattenvertiefungen		
		mikro-ELISA	IPF auf (60)- Terasaki- platten	IPF auf (96)-Mi- kroplatten
1	151/264 (57,1%)	24/151 (16%)	8	
2	225/264 (85,2%)	42/225 (19%)	8	
3	308/352 (87,5%)	63/308 (20%)	6	
4	187/264 (70,8%)	34/187 (18%)	5	
5	288/352 (81,8%)	49/288 (17%)	7	
6	176/264 (66,6%)	15/176 (9%)	1	
7	162/264 (61,3%)	21/162 (13%)	1	
8	187/264 (70,8%)	26/187 (14%)	4	
9	76/176 (43,1%)	10/ 76 (13%)	0	
10	305/352 (86,6%)			6
11	289/352 (82,1%)	42/289 (15%)	2	
12	431/440 (97,9%)			38

Die Kolonien, deren Überstände in der IPF positiv reagierten, wurden isoliert und sofort kloniert (Endpunktverdünnungsmethode), wobei angenommen wurde, daß pro Vertiefung nur eine Hybridzelle entstanden war und sich geteilt hatte. Damit konnte sichergestellt werden, daß wirklich verschiedene Hybridome kloniert wurden.

Die Klonierung erfolgte dreimal, wobei im Idealfall in der 3. Klonierungsstufe die Antikörperproduktion der getesteten Vertiefungen annähernd 100% betrug.

Von den 48 IPF-positiven Kolonien (Fusionen 1-11) verloren 18 ihre Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion schon während der ersten Klonierung, ohne sich in ihrem Wachstumsverhalten von Produzenten zu unterscheiden. Bei 4 Hybridomkolonien fiel die Antikörperproduktion während der drei Klonierungsstufen ab und versiegte dann ganz (Tab. 5). Manche Klone zeigten erst nach Wochen bzw. Monaten nachlassende Produktion, wobei aber erfolgreich auf eingefrorene Reserven früherer Passagen zurückgegriffen werden konnte.

Tabelle 5: Stabilität der Antikörperproduktion von IPF-positiven Hybridomkolonien aus den Fusionen 1-11 während der 3 Klonierungsstufen

Fus. Nr.	Anzahl der Hybridomkolonien mit Antikörperproduktion			
	vor 1. Klonierung	nach 1. Klonierung	nach 2. Klonierung	nach 3. Klonierung
1	8	6	6	6
2	8	5*	4	4
3	6	3*	2	2
4	5	3	3	3
5	7	3	3	3
6	1	1	1	1
7	1	1	1	1
8	4	3	3	3
9	0			
10	6	4**	2	2
11	2	1	1	1

* 1 Kolonie bzw. ** 2 Kolonien zeigen schwache Reaktion

1.3 Selektion gliombindender Antikörper aus den Fusionen 1-11

1.3.1 Spezifitätsuntersuchungen

Nach der 3. Klonierungsstufe konnte davon ausgegangen werden, daß die Antikörper wirklich monoklonal vorlagen und die verschiedenen Kulturüberstände wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber Gliazellen untersucht. Dazu wurden sie mittels IPF auf Kryostatschnitten von Tumor- und normalem Hirngewebe getestet (Tab. 6).

Die 16 Hybridomklone, deren Antikörper auch Gliazellen erkannten, wurden eingefroren und nur die 10 Klone weiterkultiviert, deren mAk selektiv mit Tumorgewebe reagierten.

Ihre Bezeichnung richtete sich nicht mehr nach den Koordinaten der Fusionslöcher, aus denen sie isoliert worden waren, sondern ihre Nomenklatur erfolgte systematisch als MUC X-Y. Lediglich bei Fusion 1 wurden die Hybridome bereits vor den Klonierungen umbenannt. Dabei gilt:

MUC = "murine clone"

X = fortlaufend numerierte Klone

Y = die zur Immunisierung verwendete Zelllinie.

1.3.2 Kreuzreaktivität

Spezifisch gliombindende Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität mit anderen humanen Gliomzellen, Rattengliomzellen (79FR-G-41), Harnblasenkarzinomzellen (EJ) und embryonalen Zellen humanen Ursprungs mit Hilfe der IPF untersucht (Tab. 7).

Dabei zeigte sich, daß sowohl MUC 1-9 (ein mAk gegen embryonale Hirnzellen des Menschen) alle Tumorzellen humanen Ursprungs erkannte, als auch alle anderen mAk gegen Gliomzellen (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 2-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-66) mit embryonalen bzw. mit allen menschlichen Tumorlinien kreuzreagierten. Die Rattengliomzellen wurden jedoch von keinem mAk erkannt.

Diese Untersuchungen wurden mit nativem Kulturüberstand der einzelnen Hybridomklone auf (60)-Terasakiplatten durchgeführt, wobei die semikonfluent gewachsenen Zellen Methanol/Aceton-fixiert waren.

Tabelle 6: Darstellung der Spezifität gliombindender Antikörper aus den Fusionen 1-11 mittels IPF auf Kryostatschnitten

Fus. Nr.	Hybridomkolonie	Gliomgewebe*		Hirngewebe		Bezeichnung der etablierten Hybridomklone/mAk
		N22/86	N23/86	Großhirn	Kleinhirn	
1	1C8	++	++	++	++	
	1D4	+++	++	++	+++	
	2E8	+++	+++	+++	+++	
	2F9	++	++	+	++	
	3D12	+	+	+	+	
	3B7	++	+++	-	+	MUC 8-22
2	1G3	+++	++	++	++	
	1C6	+++	+++	-	+	MUC 1-59
	2C3	+++	+++	-	-	MUC 2-59
	3H9	++	+	+	+	
3	2D8	++	+++	-	-	MUC 1-63
	4B3	++	+++	+	++	
4	1E7	+++	+++	++	++	
	2D10	+++	+++	-	+	MUC 2-63
	2F9	++	++	++	++	
5	1C8	+++	+++	+++	+++	
	2B11	++	+++	-	-	MUC 1-64
	4G1	++	++	++	++	
6	2B5	+++	+++	++	+++	
7	3H4	++	++	+	++	
8	1F3	+++	+++	+++	+++	
	2A7	+++	++	-	+	MUC 1-65
	3D2	+++	++	-	-	MUC 2-65
9	-					
10	1G9	++	++	++	++	
	4D6	+++	+++	-	+	MUC 1-66
11	3C2	+++	+++	-	-	MUC 1-9

* N22/86: Glioblastom; N23/86: Astrozytom II;

- negativ; + einige positive Zellen;

++ weniger als 50% positive Zellen; +++ mehr als 50% positive Zellen

Tabelle 7: Kreuzreaktionen der mAk aus den Fusionen 1-11 mit verschiedenen Zellen (IPF)

Anti- körper	85HG -59	85HG -63	85HG -64	85HG -65	85HG 66T6	86HG -39	86HE-9* H G	EJ	79FR G-41
MUC 8-22	++	+++	++	++	++	++	++ +	++	-
MUC 1-59	+++	++	+++	++	++	++	+++ ++	++	-
MUC 2-59	+++	+++	++	++	++	+	++ +	++	-
MUC 1-63	++	+++	+	++	++	++	++ +	+	-
MUC 2-63	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++ +++	++	-
MUC 1-64	++	+	+++	++	++	++	++ ++	++	-
MUC 1-65	++	++	++	++	+++	++	++ +	++	-
MUC 2-65	+	++	++	+++	+++	+	++ +	++	-
MUC 1-66	+++	++	+++	++	+++	++	+++ ++	++	-
MUC 1-9	+	++	++	++	+++	++	+++ +++	++	-

*H: embryonale Hirnzellen

G: embryonale Zellen von verschiedenen Körpersegmenten

- negativ; + schwach positiv; ++ positiv; +++ stark positiv;

1.3.3 Bindungsverhalten an nativen bzw. fixierten Zellen

Nachdem für die geplanten in vitro und in vivo Untersuchungen mAk benötigt wurden, die neben spezifischen Bindungseigenschaften an Gliomzellen diese insbesondere in nativem Zustand erkennen müssen, wurden Vergleichsstudien über das Bindungsverhalten an nativen und fixierten Zellen (Methanol/Aceton bzw. Glutaraldehyd) durchgeführt (Tab. 8). Dabei zeigten zwei Antikörper (MUC 2-63 und MUC 1-66) auch mit nativen Zellen eine positive Reaktion. Alle anderen mAk gegen Gliomzellen (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65) sowie der mAk gegen embryonale Hirnzellen (MUC 1-9) reagierten nur mit fixierten Zellen.

Die Beurteilung erfolgte als ja/nein-Entscheidung, wobei jedoch allgemein die Tendenz zu erkennen war, daß Methanol/Aceton-fixierte Zellen von allen mAk besser erkannt wurden als solche, die mit Glutaraldehyd fixiert worden waren.

Tabelle 8: Bindungsverhalten der mAk aus den Fusionen 1-12 an nativen und fixierten Zellen (IPF)

Anti- körper	85HG-59 n M/A G	85HG-63 n M/A G	85HG-64 n M/A G	85HG-65 n M/A G	85HG-66T6 n M/A G	86HG-39 n M/A G	86HE-9 n M/A G	EJ n M/A G	79FR-G-41 n M/A G
MUC 8-22	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-59	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 2-59	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-63	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 2-63	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-64	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-65	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 2-65	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-66	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 1-9	- +	- +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
MUC 2-39	- -	- -	- -	- -	+ +	+ +	- -	- -	- -
MUC 5-39	- -	- -	- -	- -	+ +	+ +	- -	- -	- -
MUC 7-39	- -	- -	- -	- -	+ +	+ +	- -	- -	- -

n native Zellen
M/A Methanol/Aceton-fixiert
G Glutaraldehyd-fixiert

1.4 Selektion gliombindender Antikörper aus der Fusion 12

Bei der zuletzt durchgeführten Fusion war die Ausbeute an wachsenden (97,9% der Plattenvertiefungen) und Antikörper produzierenden (38 IPF-positive Kulturüberstände) Hybridomkolonien wesentlich höher als bei den Fusionen 1-11 (Tab. 4). Nachdem bei den vorausgegangenen 11 Fusionen nur 2 Klone etabliert werden konnten, deren Antikörper spezifisch mit nativen Gliomzellen reagierten, wurde dieses Kriterium bei Fusion 12 zuerst berücksichtigt.

Alle 38 IPF-positiven Kulturüberstände wurden zunächst auf ihre Bindungseigenschaften an nativen 86HG-39 Zellen getestet, wobei 9 positiv reagierten und sofort kloniert wurden. Die 29 Kolonien, deren Antikörper die nativen Zellen nicht erkannten, wurden eingefroren.

Im Laufe der drei Klonierungsstufen verloren 2 Kolonien ihre Fähigkeit zur Antikörperproduktion. Die verbliebenen 7 Klone (MUC 1-39 bis MUC 7-39) wurden erst jetzt hinsichtlich ihrer Spezifität getestet, wobei Kryostatschnitte des Originaltumors (N39/86) verwendet werden konnten. Dabei zeigten 3 Klone (MUC 2-39, MUC 5-39, MUC 7-39) eine spezifische Bindung an den zur Immunisierung verwendeten Tumor, während sie normales Gliagewebe nicht erkannten. Nur sie wurden weiterkultiviert und die 4 Klone, die sowohl mit dem Tumor als auch mit normalem Hirngewebe reagierten, wurden eingefroren.

Die Austestung der 3 gliomspezifischen Antikörper hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität (IPF) ergab, daß nur Zellen der Linien 86HG-39 und 85HG-66-T6 erkannt wurden, während mit anderen Tumoren und embryonalen Zellen keine Reaktion stattfand (Tab. 8).

Obwohl in der indirekten Immunperoxidasefärbung keine Bindung erkennbar war, zeigten die 3 spezifischen Antikörper im mikro-ELISA gegenüber den anderen Gliomzelllinien eine schwache Reaktion (Abb. 1b). Dies läßt vermuten, daß im ELISA-System eine Hintergrundfärbung auftreten kann, die jedoch keine Rückschlüsse auf das Bindungsvermögen der Antikörper an Zellen zuläßt.

1.5 Lokalisation des Reaktionsproduktes von MUC 8-22 und MUC 2-63 mittels indirekter Immunfluoreszenz

In der IPF war zu erkennen, daß monoklonale Antikörper, die an native Zellen binden (MUC 2-63), diese gleichmäßig markieren, während mAk, die nur mit fixierten Zellen reagieren (MUC 8-22), eine körnige Anfärbung des Zytoplasmas zeigen.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte an nativen Zellen der Linie 85HG-63 dargestellt werden, daß MUC 2-63 eine starke Membranfluoreszenz aufweist, während MUC 8-22 an native Zellen nicht bindet.

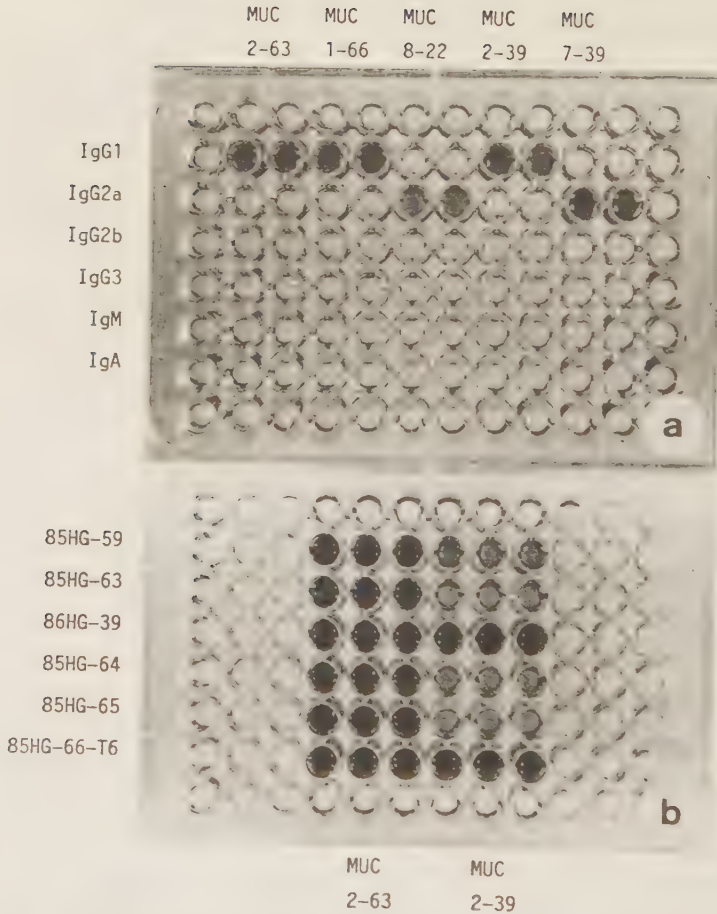
An Methanol/Aceton-fixierten Zellen zeigt MUC 8-22 eine deutliche zytoplasmatische Fluoreszenz und MUC 2-63 reagiert auch an fixierten Zellen vorwiegend mit membranständigen Epitopen (Abb. 6a,c).

1.6 Bestimmung der Immunglobulinsubklassen

Serumfreie und mit Ammoniumsulfat präzipitierte Kulturüberstände (ca. 100 µg Ig/ml) der einzelnen Hybridomklone wurden sowohl im Agargel-Immunodiffusionstest als auch im ELISA-Verfahren gegen Kaninchen-anti-Maus Antiseren getestet. Samtliche Hybridomklone produzierten IgG-Antikörper verschiedener Subklassen (Tab. 9; Abb. 1a).

Tabelle 9: Immunglobulinsubklassen der mAk aus den Fusionen 1-12

Hybridom- klon/mAk	Sub- klasse	Hybridom- klon/mAk	Sub- klasse
MUC 8-22	IgG2a	MUC 2-65	IgG2a
MUC 1-59	IgG2b	MUC 1-66	IgG1
MUC 2-59	IgG2a	MUC 1-9	IgG2a
MUC 1-63	IgG1	MUC 2-39	IgG1
MUC 2-63	IgG1	MUC 5-39	IgG1
MUC 1-64	IgG3	MUC 7-39	IgG2a
MUC 1-65	IgG1		



1.7 Anreicherung und Reinigung der monoklonalen Antikörper

Durch die Verwendung von FEB-100 Medium konnten von allen Hybridomklonen größere Mengen an serumfreien Kulturüberständen gewonnen werden, wobei der Proteingehalt ca. 50-75 µg/ml betrug.

Die in vivo Anreicherung durch Aszitesproduktion war bei manchen Hybridomklonen (MUC 1-64, MUC 1-9) selbst bei 10^7 transplantierten Zellen nicht möglich, während bei MUC 2-63 schon 10^6 Zellen ausreichten, um nach 10-12 Tagen 3-7 ml Aszitesflüssigkeit mit einem Proteingehalt von 2-5 mg/ml gewinnen zu können.

Diese wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert und anschließend affinitätschromatographisch über eine Protein-A-Sepharose-Säule gereinigt. Dabei war die Bindung der IgG1-Antikörper schwierig und konnte nur bei hoher Ionenstärke mit 1,5 M Glycin/ 3 M NaCl-Bindungspuffer zufriedenstellend erfolgen, während nach Verwendung eines 0,14 M Phosphatpuffers bis zu 85% der IgG1-Moleküle sofort eluiert wurden.

2. Antigencharakterisierung

Wasserlösliche Membranbestandteile von Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 86HG-39 wurden nach ihrer Präparation mittels SDS-PAGE (Konzentrationsgradient 4-15%) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Makromoleküle wurden dann an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert (Western-Blot) und konnten immunchemisch mittels mAk (MUC 2-63, MUC 2-39, MUC 5-39, MUC 7-39) als scharfe bzw. diffuse Banden identifiziert werden.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde für die Markerproteine auf halb-logarithmischem Papier eine Eichgerade gezeichnet, auf der das Molekulargewicht der jeweiligen GAA nach Messung der Bandenwanderungsstrecken gefunden werden konnte (Abb. 2).

Dabei ergab sich, daß alle drei mAk gegen 86HG-39 mit einer scharfen Bande im Bereich von 32 kd reagierten und dies auch nach Reduktion der Membranpräparation mit 2-Mercaptoethanol noch möglich war. MUC 2-63 hingegen färbte auf der Nitrozellulosemembran einen diffusen Bereich zwischen 80 und 190 kd mit einer deutlichen Verdichtung bei 85 kd, während nach Reduktion keine Reaktion mehr sichtbar war.

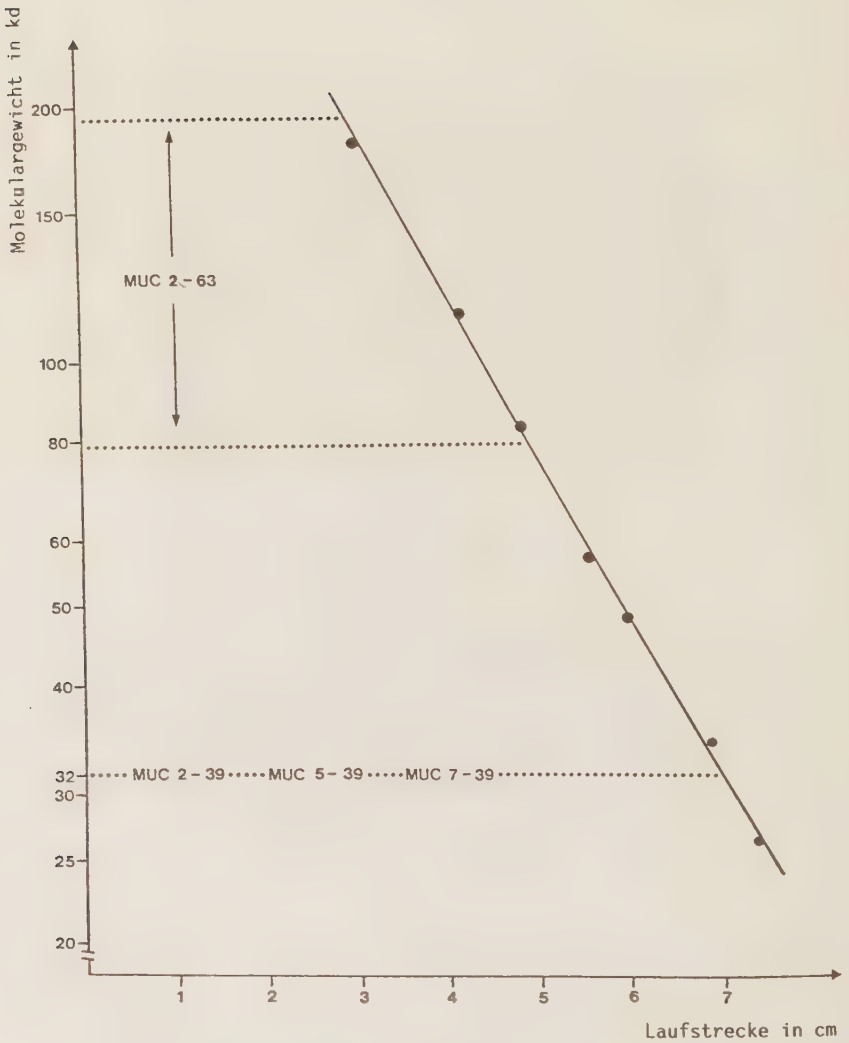


Abb. 2: Molekulargewichtsbestimmung der GAA; während MUC 2-39, MUC 5-39 und MUC 7-39 mit einer scharfen Bande im Bereich von 32 kd reagieren, färbt MUC 2-63 einen Bereich von 80-190 kd.

● = Standards

3. Natürliche und Komplement-vermittelte Zytotoxizität von nativem MUC 2-63

Präzipitierter und affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper aus Aszitesflüssigkeit von BALB/c-Mäusen, denen der Hybridomklon MUC 2-63 i.p. transplantiert worden war, wurde nach Inaktivierung (30 min bei 56°C) hinsichtlich einer natürlichen oder komplementabhängigen Zytotoxizität gegen die Gliomzelllinie 85HG-63 getestet.

Dazu wurde die Immunglobulinkonzentration mit Medium auf ca. 20 µg/ml eingestellt und der Versuch jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

Dabei war jedoch der Prozentsatz der lebenden Zellen nach Einwirkung des Antikörpers mit und ohne Komplement kaum geringer als bei den entsprechenden Kontrollen mit Myelomzellüberstand (Tab. 10).

Nachdem die Antikörperbindungsaktivität mittels IPF überprüft worden war, konnte aus den Versuchsergebnissen geschlossen werden, daß MUC 2-63 weder eine natürliche noch eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität gegenüber den Gliomzellen aufweist.

Tabelle 10: Natürliche bzw. Komplement-vermittelte Zytotoxizität von MUC 2-63 gegenüber den Gliomzellen 85HG-63

Inkubation mit	Lebende Zellen (%) in den Vertiefungen			Durchschnitt(%)
X63-Ag8.653	94	98	97	96,3
X63-Ag8.653 + Komplement (1:10)	85	82	79	82,0
X63-Ag8.653 + Komplement (1:20)	88	91	89	89,3
MUC 2-63	96	93	97	95,3
MUC 2-63 + Komplement (1:10)	81	83	80	81,3
MUC 2-63 + Komplement (1:20)	85	90	88	87,6

4. Konjugation von MUC 2-63 an Daunomycin

Nach der Umsetzung von Daunomycin mit cis-Aconitsäureanhydrid wurden als Reaktionsprodukt 4 μMol Daunomycin-Aconitsäureanhydrid (in 400 μl) erhalten, dessen Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie (DC) geprüft wurde. Im Reaktionsprodukt war kein freies Daunomycin mehr nachweisbar und es enthielt lediglich noch Spuren von cis-Aconitsäureanhydrid.

Anschließend wurden 160 nMol mAk (25,6 mg) und 8 μMol 1-Äthyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimidhydrochlorid (1,5 mg) zugefügt. Nach Inkubation und Gelfiltration (Abb. 3) wurden die einzelnen Fraktionen mittels DC auf Verunreinigungen mit unkonjugiertem Daunomycin geprüft. Die proteinreichen Fraktionen 7-11 enthielten keine nachweisbaren Mengen an freiem DM und dienten als Konjugat für die in vitro Versuche. Die Fraktionen 12-15 enthielten geringe Mengen unkonjugiertes Daunomycin und wurden nach nochmaliger Gelfiltration eingefroren.

Die quantitative Zusammensetzung des Konjugates wurde photometrisch bestimmt und betrug nach 1:10 Verdünnung:

$$A_{280} = 0,561 \text{ d.h. } 400 \mu\text{g Ig/ml} (= 2,5 \mu\text{M})$$

$$A_{495} = 0,141 \text{ d.h. } 8 \mu\text{g DM/ml} (= 14,1 \mu\text{M})$$

Damit waren durchschnittlich 5,6 Moleküle Daunomycin an ein Molekül MUC 2-63 gebunden worden.

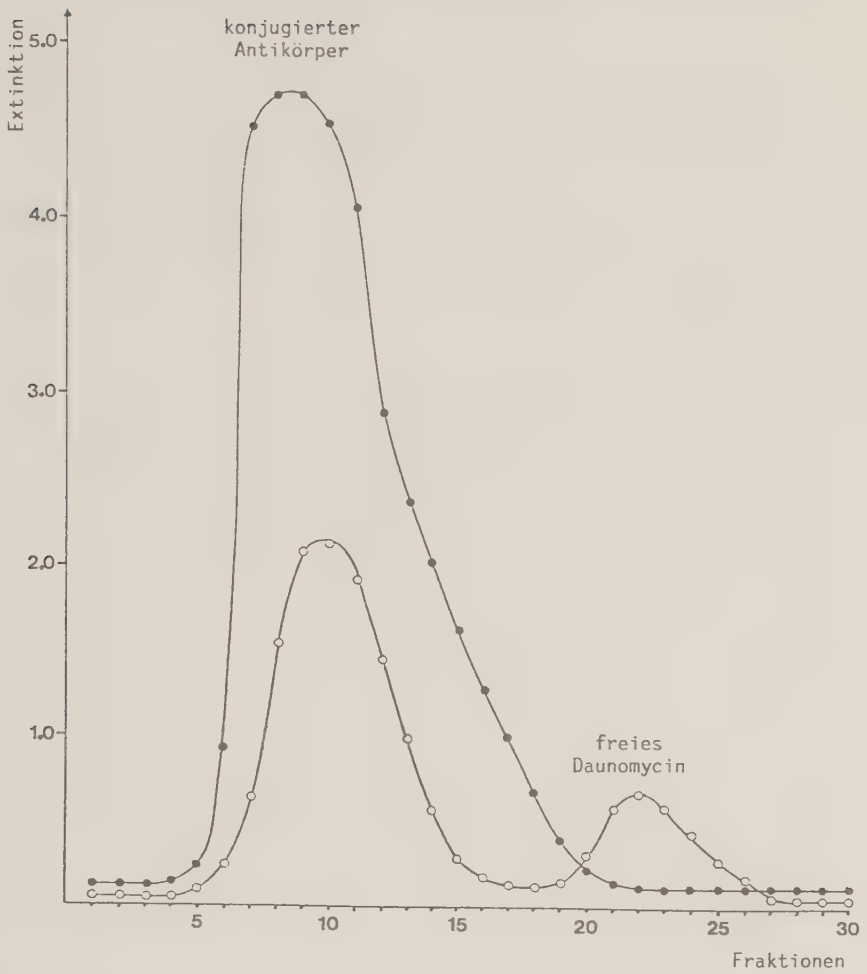


Abb. 3: Gelfiltration des monoklonalen Antikörpers (MUC 2-63) nach Konjugation mit Daunomycin (Gel: Sephadex G-25/fine);
●—● Absorption bei 280 nm (Immunglobulin)
○—○ Absorption bei 495 nm (Daunomycin)

4.1 Bindungsfähigkeit von nativem und Daunomycin-konjugiertem

MUC 2-63

Die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers MUC 2-63 nach der Konjugation an DM wurde mittels IPF auf Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41C₈ (jeweils nativ und Methanol/Aceton-fixiert) nachgewiesen.

Dazu wurde das Konjugat in verschiedenen Konzentrationen (von 6,25 µg Ig/ml bis 200 µg Ig/ml) getestet. Als Kontrolle diente nativer Antikörper (präzipitierter Aszites und serumfreier Kulturüberstand) in den gleichen Proteinkonzentrationen.

Dabei zeigte der konjugierte Antikörper in allen Verdünnungen quantitativ und qualitativ das gleiche Bindungsverhalten wie der native Antikörper: Beide erkannten die Rattengliomzellen (79FR-G-41C₈) nicht, reagierten aber in allen Verdünnungsstufen sowohl mit Methanol/Aceton-fixierten als auch mit lebenden Gliomzellen humanen Ursprungs (Tab. 11). Daraus kann gefolgert werden, daß MUC 2-63 durch die Konjugation an Daunomycin in seiner Immunreaktivität nicht verändert wurde.

Tabelle 11: IPF von Gliomzellen mit nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 (Bewertung: - bis +++)

Antikörper	µg Ig/ ml	85HG-63		79FR-G-41C ₈	
		nativ	fixiert	nativ	fixiert
Aszites bzw. serumfreier Kulturüber- stand von MUC 2-63	200	+++	+++	-	-
	100	+++	+++	-	-
	50	+++	+++	-	-
	25	+++	+++	-	-
	12,5	+++	+++	-	-
	6,25	++	++	-	-
Konjugierter MUC 2-63	200	+++	+++	-	-
	100	+++	+++	-	-
	50	+++	+++	-	-
	25	+++	+++	-	-
	12,5	+++	+++	-	-
	6,25	++	++	-	-

4.2 Beeinflussung der Tumorzellproliferation in vitro durch nativen und Daunomycin-konjugierten MUC 2-63

Nach Inkubation von Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41_{C8} mit verschiedenen Konzentrationen von nativem bzw. Daunomycin-konjugiertem Antikörper sowie freiem DM (1 und 72 Stunden) wurden die adhären-ten Zellen der Doppelansätze abtrypsiniert und gezählt (Tab. 12). Dabei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Der native Antikörper hatte keinen Einfluß auf das Proliferationsver-halten beider Zelllinien in Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Nähr-medium durchgeführt wurde.

Bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde konnte der konjugierte An-tikörper die Antigenbindungsstellen der Zielzellen absättigen und be-wirkte eine dosisabhängige Depression der Tumorzellproliferation (74% bei 8 µg DM/ml, 22% bei 0,2 µg DM/ml), während bei den Rattengliomzel-len keine Wirkung erkennbar war. Dies wurde als Bestätigung für die Stabilität des Konjugates gewertet, da das gekoppelte Daunomycin wäh-rend der kurzen Inkubationszeit von Antigen-negativen Zellen nicht aufgenommen werden konnte. Freies Daunomycin hingegen bewirkte eine dosisabhängige Proliferationshemmung bei beiden Zelllinien, die jedoch deutlich weniger ausgeprägt war als bei gekoppeltem DM.

Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden zeigte der konjugierte An-tikörper eine geringe Wachstumshemmung auf die Rattengliomzellen (14% bei 8 µg gekoppeltem DM/ml), während freies DM sehr stark antiprolife-rativ wirkte (81% bei 8 µg freiem DM/ml). Auf die Targetzellen 85HG-63 zeigte der konjugierte Antikörper nach 72 Stunden eine stärkere Wachs-tumsdepression als nach einer Stunde, wobei fast kein Unterschied mehr in der dosisabhängigen Wirkung von freiem und gekoppeltem DM zu erken-nen war (Abb. 4).

Die nach der Inkubation verbliebenen adhären-ten Zellen unterschieden sich im Phasenkontrast-Mikroskop auch morphologisch von unbehandelten Kontrollkulturen. Sie erschienen zweidimensional, ohne hellen Hof und waren durch einen sichtbaren großen Zellkern gekennzeichnet, der fast die ganze Zelle ausfüllte (Abb. 8).

Tabelle 12: Einfluß von nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 sowie von freiem Daunomycin auf die Proliferation von Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41_{C8} in vitro

Inkubationsmedium	Konzentration der Wirksubstanz (µg/ml)	Zellzahl ($\times 10^3$) 85HG-63		Zellzahl ($\times 10^3$) 79FR-G-41 _{C8}	
		1 Std. (%)	72 Std. (%)	1 Std. (%)	72 Std. (%)
HCM	-	561	558	874	879
HCM + nativer Antikörper	400 Ig	563(100)	564(100)	880(100)	881(100)
	200 Ig	559 (99)	559(100)	875(100)	882(100)
	100 Ig	562(100)	561(100)	881(100)	875(100)
	50 Ig	560(100)	562(100)	878(100)	877(100)
	10 Ig	563(100)	560(100)	876(100)	880(100)
HCM + DM-konjugierter Antikörper	400Ig/8,0DM	145 (26)	90 (16)	877(100)	760 (86)
	200Ig/4,0DM	185 (33)	104 (19)	874(100)	768 (87)
	100Ig/2,0DM	218 (39)	142 (25)	879(100)	795 (90)
	50Ig/1,0DM	258 (46)	201 (36)	880(100)	807 (91)
	10Ig/0,2DM	442 (78)	434 (77)	878(100)	862 (98)
HCM +DM	8,0 DM	332 (59)	97 (17)	516 (59)	167 (19)
	4,0 DM	347 (62)	114 (20)	557 (63)	193 (22)
	2,0 DM	364 (65)	202 (36)	596 (68)	307 (35)
	1,0 DM	448 (80)	230 (41)	689 (78)	377 (43)
	0,2 DM	558 (99)	420 (75)	820 (93)	680 (77)

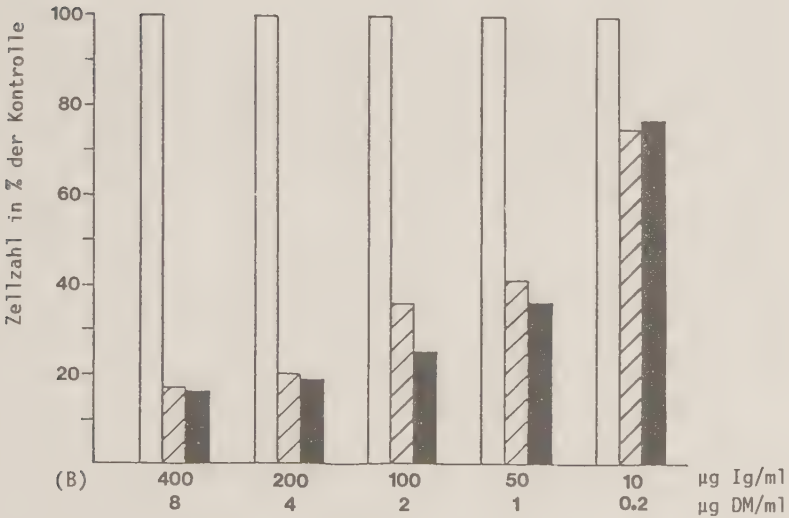
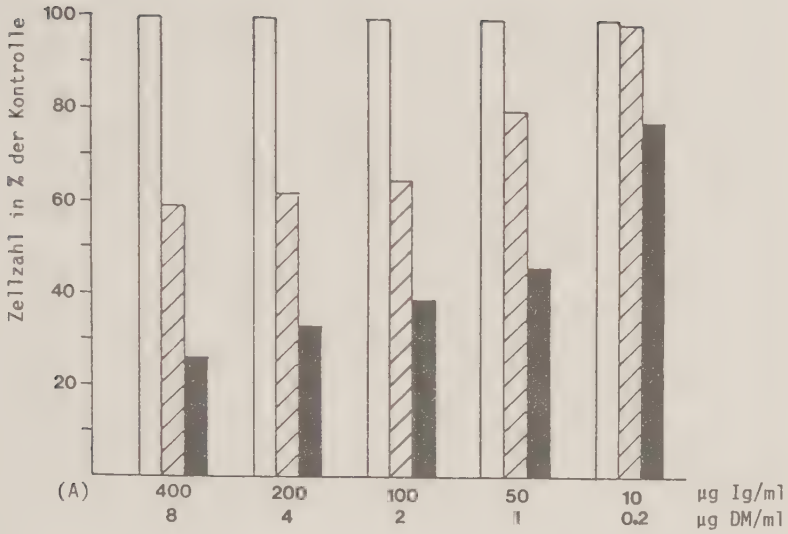


Abb. 4: Einfluß von nativem MUC 2-63 $\square$, freiem Daunomycin $\square$ und DM-MUC 2-63 $\blacksquare$ auf das Proliferationsverhalten der Zellen 85HG-63. Nach einer Stunde Inkubation (A) bewirkt der konjugierte Antikörper die deutlichste Proliferationsdepression, während nach 72 Stunden Inkubation (B) DM-MUC 2-63 und freies DM ähnliche antiproliferative Eigenschaften zeigen.

4.3 Beeinflussung der Vitalität bzw. Stoffwechselaktivität der Gliomzellen durch Inkubation mit nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 (MTT-Test)

Die Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41_{C8} wurden auf (96)-Mikroplatten für 1 oder 72 Stunden mit nativem bzw. DM-konjugiertem monoklonalen Antikörper (MUC 2-63) sowie mit freiem DM in den gleichen Konzentrationen wie beim Proliferationshemmungstest inkubiert. Nach 3 Tagen wurde der MTT-Test durchgeführt und von jedem Versuchsansatz (jeweils 8 Vertiefungen) die durchschnittliche Extinktion berechnet (Tab. 13). Auch hier zeigte der native Antikörper keine Wirkung auf beide Zelllinien.

Nach einstündiger Inkubation war bei Anwendung von konjugiertem mAk eine deutlich geringere Extinktion bei den Plattenvertiefungen, die die Zielzellen enthielten festzustellen (0,102; 8 µg gekoppeltes DM/ml) als bei freiem DM (0,233; 8 µg/ml). Bei den Rattengliomzellen wirkte sich nur unkonjugiertes DM auf die Extinktion aus (Abb. 5).

Nach 72 Stunden zeigten sowohl das Konjugat wie auch freies DM starke Wirkung auf die Targetzellen. Bei den Rattengliomzellen wirkte sich der konjugierte Antikörper vergleichsweise gering aus (0,479; 8 µg gekoppeltes DM/ml), während freies DM eine sehr starke Erniedrigung der Extinktionswerte (0,106; 8 µg/ml) bewirkte.

Tabelle 13: Einfluß von nativem und Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 sowie von freiem Daunomycin auf die Vitalität der Gliomzellen der Linien 85HG-63 und 79FR-G-41_{C8} (MTT-Test)

Inkubations- medium	Konzentra- tion der Wirk- substanz (µg/ml)	Extinktion 85HG-63		Extinktion 79FR-G-41 _{C8}	
		1 Std.	72 Std.	1 Std.	72 Std.
HCM	-	0,396	0,389	0,562	0,558
HCM + nati- ver Anti- körper	400 Ig	0,389	0,384	0,568	0,553
	200 Ig	0,383	0,396	0,557	0,562
	100 Ig	0,392	0,390	0,560	0,559
	50 Ig	0,394	0,386	0,562	0,563
	10 Ig	0,391	0,388	0,555	0,558
HCM + DM- konjugierter Antikörper	400 Ig/8,0 DM	0,102	0,066	0,564	0,479
	200 Ig/4,0 DM	0,133	0,073	0,559	0,489
	100 Ig/2,0 DM	0,157	0,102	0,567	0,502
	50 Ig/1,0 DM	0,182	0,149	0,561	0,519
	10 Ig/0,2 DM	0,338	0,330	0,552	0,546
HCM + DM	8,0 DM	0,233	0,062	0,331	0,106
	4,0 DM	0,252	0,077	0,354	0,124
	2,0 DM	0,269	0,139	0,382	0,195
	1,0 DM	0,326	0,159	0,438	0,244
	0,2 DM	0,389	0,291	0,522	0,429

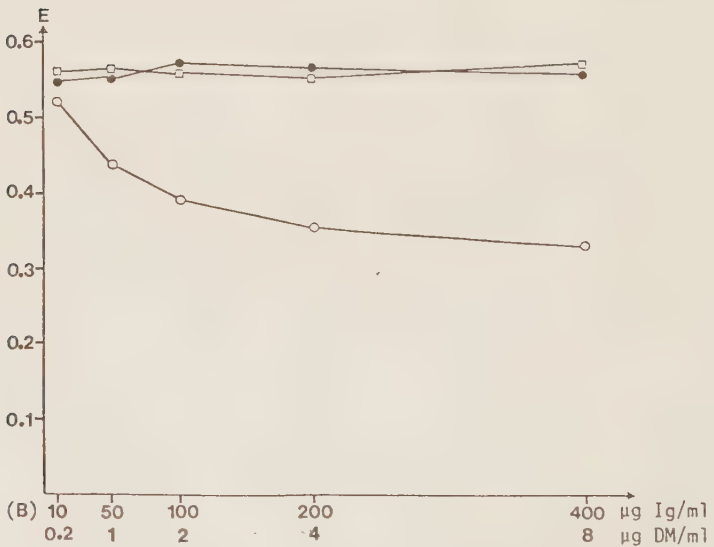
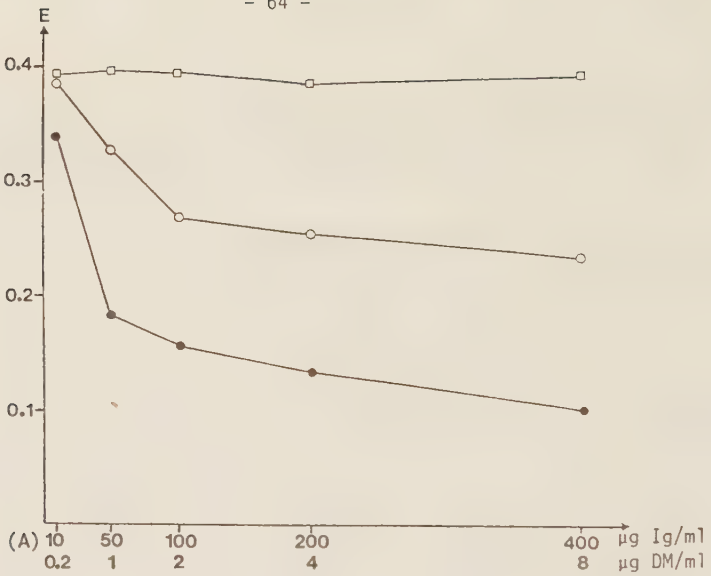


Abb. 5: Beeinflussung der Stoffwechselaktivität von 85HG-63 (A) und 79FR-G-41_{C8} (B) durch Inkubation mit nativem MUC 2-63 □-□, freiem Daunomycin ○-○ und DM-MUC 2-63 ●-● für 1 Stunde (MTT-Test). Der konjugierte Antikörper bewirkt an den Zielzellen (A) eine deutliche Erniedrigung des Extinktionswertes, während die Ratengliomzellen (B) nur durch freies DM beeinflusst werden.

5. Bindungsverhalten der Jod- 131 markierten monoklonalen Antikörper MUC 8-22 und MUC 2-63 in vivo

5.1 Externe Szintigraphie

Unter Verwendung der durch unterschiedliche Bindungseigenschaften in vitro gekennzeichneten mAk MUC 8-22 (erkennt nur intrazelluläre Strukturen fixierter Zellen) und MUC 2-63 (reagiert mit Oberflächendeterminanten lebender Zellen) konnte gezeigt werden, daß diese Unterschiede sich auch in vivo bestätigen.

Nach Verabreichung von ca. 30 µg markiertem Antikörper mit einer Aktivität von 200 µCi (7,4 MBq) pro Tier wurden 4, 8 und 12 Tage p.i. die Scanning-Aufnahmen durchgeführt. Dabei zeigte MUC 2-63 nach 4 Tagen eine deutliche Akkumulation der Radioaktivität im Tumorgewebe und in der unblockierten Schilddrüse (Hinweis auf die in vivo-Dejodierung der Antikörper). Dieses Bindungsverhalten blieb im weiteren Verlauf (8 und 12 Tage p.i.) in dieser Form erhalten, wobei aber die Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Jod-Halbwertszeit abnahm (Abb. 6b).

Mittels markiertem MUC 8-22 konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Tumordarstellung erreicht werden, sondern als Folge des Durchblutungseffektes stellte sich immer der gesamte Tierkörper dar (Abb. 6d).

5.2 Beeinflussung des Tumorstwachstums durch 131 Jod markierten MUC 2-63

Vier Nacktmäuse erhielten jeweils ca. 45 µg 131 J-MUC 2-63 mit einer Aktivität von 300 µCi (11,1 MBq) zweimal im Abstand von drei Wochen i.p. appliziert. Die Injektionen erfolgten am 55. und 76. Tag nach der Transplantation der Tumorzellen (85HG-66-T6). Das Bindungsverhalten des markierten Antikörpers wurde mittels externer Szintigraphie und das Tumorstwachstum durch Messung mit einer Schublehre verfolgt. Dabei wurden die Tumoren immer in zwei Dimensionen gemessen und als Maß für die Tumorstgröße (T) die Wurzel aus dem Produkt der zwei Durchmesser gezogen (Tab. 14).



Abb. 6: Unterschiedliches Bindungsverhalten von MUC 2-63 (a und b) und MUC 8-22 (c und d) in vitro und in vivo;

(a) und (c): Indirekte Fluoreszenz auf Methanol/Aceton-fixierten Cytospinpräparaten von 85HG-63 (x 400);

(a) Membranfluoreszenz nach Anwendung von MUC 2-63 und

(c) zytoplasmatische Fluoreszenz nach Anwendung von MUC 8-22.

(b) und (d): Externe Szintigraphie am 8. Tag nach Injektion von

(b) ^{131}J -MUC 2-63 mit deutlicher Darstellung von Tumor und Schilddrüse

(d) ^{131}J -MUC 8-22 mit gleichmäßiger Verteilung der Aktivität, jedoch ohne spezifische Antikörperakkumulation im Tumorgewebe.

Bei einer unbehandelten Kontrollgruppe (vier Tiere) wurde das Tumorstadium zu den gleichen Zeitpunkten nach Inokulation der Gliomzellen verfolgt (Abb. 7 und 9).

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 50 Tage nach der ersten Applikation von ^{131}J -MUC 2-63. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Kontrolltiere ein relativ steiles lineares Wachstum aufwiesen, während die behandelten Tiere ein stagnierendes Wachstum zeigten.

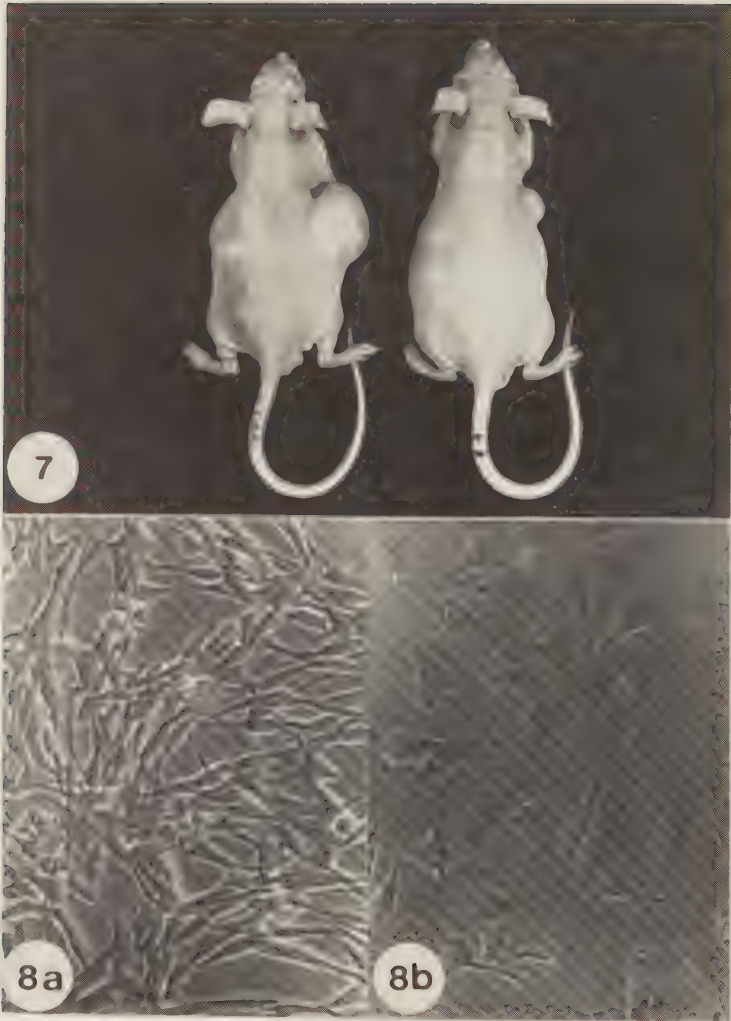


Abb. 7: Stagnierendes Wachstum des Tumors (85HG-66-T6) nach Behandlung mit ^{131}I -MUC 2-63 (rechts) im Vergleich zum Kontrolltier (links).

Abb. 8: Deutlich verminderte Zellzahl und veränderte Morphe der Zellen 85HG-63 (b) nach Inkubation mit Daunomycin-konjugiertem MUC 2-63 ($8\text{ }\mu\text{g DM/ml}$) im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur (a). (Phasenkontrast x 200).

Tabelle 14: Beeinflussung des Tumorstwachstums durch Verabreichung von ^{131}I -MUC 2-63
(jeweils 45 μg Ig, 300 $\mu\text{Ci}/(11,1 \text{ MBq})$ am 55. und 76. Tag nach Transplantation
der Gliomzellen (85HG-66-T6)

Versuchstiere Maus Nr.	Tumormasse (T)*							
	55.Tag	66.Tag	70.Tag	76.Tag	81.Tag	84.Tag	95.Tag	103.Tag
1	1,12	1,18	1,25	1,25	1,29	1,33	gestorben	
2	0,50	0,45	0,58	0,58	0,54	0,58	0,62	0,55
3	0,98	1,03	0,78	0,90	1,12	1,27	1,27	1,30
4	0,64	0,67	0,79	0,75	0,75	0,68	gestorben	
Kontrolltiere								
Maus Nr.								
1	0,59	1,09	1,29	1,44	1,67	1,98	2,46	2,73
2	0,70	1,12	1,40	1,54	1,69	1,84	2,20	2,40
3	0,48	0,84	1,00	1,19	1,39	1,69	2,00	2,39
4	0,69	1,14	1,39	1,64	1,94	2,04	2,36	2,70

* T = Wurzel aus dem Produkt der beiden gemessenen Tumorebenen a und b ($T = \sqrt{a \times b}$)

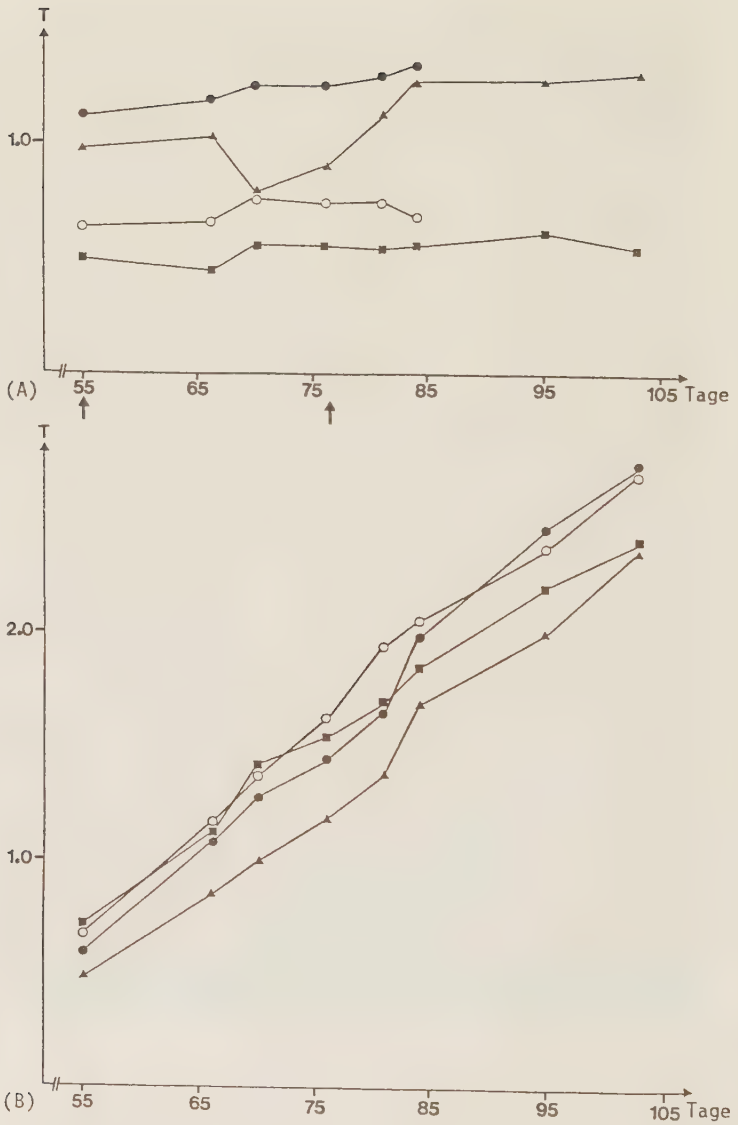


Abb. 9: Stagnation des Tumorwachstums (T) nach Injektionen (↑) von $^{131}\text{J-MUC 2-63}$ bei Maus 1 ●—●, 2 ■—■, 3 ▲—▲, 4 ○—○ (A) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (B), die ein deutlich zunehmendes Tumorwachstum zeigt.

E. DISKUSSION

Aus den zwölf beschriebenen Fusionen zwischen Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und sensibilisierten Splenozyten von BALB/c-Mäusen, die mit verschiedenen Gliomzellen (frisches Tumormaterial oder Zellkulturen) bzw. embryonalen Zellen humanen Ursprungs hyperimmunisiert worden waren, konnten zahlreiche Hybridomklone isoliert werden. 13 der etablierten Hybridomklone zeichnen sich durch eine stabile Antikörperproduktion (IgG verschiedener Subklassen) gegen das jeweilige Immunogen aus.

Beim Vergleich verschiedener Immunisierungsverfahren zeigte sich, daß mit Hilfe einer intrasplenalen Applikationstechnik (SPITZ et al., 1984) auch niedrige Zellzahlen zur Immunisierung ausreichend sein können. Darüberhinaus gelang es, mittels fraktionierter Boosterung, das heißt relativ niedrige Antigendosen i.p. an allen vier Tagen vor der Fusion (PETERS et al., 1985), sowohl die Anzahl der wachsenden Hybridomkolonien (97,9% der Plattenvertiefungen) als auch den Anteil an Hybridomklonen, die gliombindende Antikörper sezernieren (38 IPF-positiv Kulturerstände), deutlich zu steigern.

Die relativ große Zahl der Hybridomkolonien, die während der drei Klonierungsstufen die Fähigkeit zur Antikörperproduktion irreversibel verloren (42,1%), ohne sich in ihrem Wachstumsverhalten von produzierenden Varianten zu unterscheiden, dürfte auf einen oft beschriebenen Chromosomenverlust der genetisch instabilen Hybridzellen zurückzuführen sein (GODING, 1986).

Die Kulturerstände wurden zunächst auf fixierten Targetzellen getestet (insgesamt 86 positiv) und erst anschließend wurde die Spezifität und das Bindungsverhalten an lebenden Zellen geprüft (noch 5 positiv: MUC 2-63; MUC 1-66; MUC 2-39; MUC 5-39; MUC 7-39). Dabei scheinen durch die Fixierung intrazelluläre Antigenstrukturen zugänglich geworden zu sein, die an lebenden Zellen nicht erkannt werden können und demzufolge für Untersuchungen von Antikörper-Tumorzell-Reaktionen in vitro wie auch in vivo irrelevant sind. Im Rahmen von immunhistologischen Studien können intrazelluläre Bindungsstellen für mAk jedoch durchaus Bedeutung für die Immundiagnostik von Tumoren erlangen (STAVROU et al., 1987).

Für die unterschiedliche Lokalisation der Antigene (Oberflächendeterminanten oder intrazelluläre Strukturen) sprechen neben der IPF vor allem die Immunfluoreszenzuntersuchungen. Es konnte eine deutliche Membranfluoreszenz von MUC 2-63 an nativen und Methanol/Aceton-fixierten Zellen gezeigt werden, während MUC 8-22 nur an fixierten Zellen eine zytoplasmatische Fluoreszenz bewirkte.

Umgekehrt ist jedoch nicht auszuschließen, daß etliche Kolonien unentdeckt blieben, deren sezernierte Antikörper mit Oberflächendeterminanten reagiert hätten, welche aber bei der Fixierung zerstört wurden. Daher sollte bei weiteren Fusionen das Bindungsverhalten von Hybridom-überständen sowohl an unfixierten als auch an fixierten Zellen getestet werden. Auch die Fixierung des Gewebematerials ist hinsichtlich der Erhaltung von Antigenstrukturen von großer Bedeutung. So zeigten FALINI und TAYLOR (1983), daß die IPF am besten an Kryostatschnitten erfolgen sollte, da die herkömmliche Formalinfixierung relevante Antigene zerstören kann. Ebenso berichten STAVROU et al. (1987) nach Vergleichsfärbungen von Kryostat- (nativ und Aceton-fixiert) und Paraffinschnitten (Bouin-, Methanol/Aceton- und Karnovsky-fixiert), daß sich native Kryostatschnitte zur immunhistologischen Darstellung von GAA am besten eignen.

Wie die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität ergaben, erkennen neun mAk gegen GAA (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 2-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-66) und ein mAk gegen embryonale Hirnzellen (MUC 1-9) nicht nur alle untersuchten Gliomzelllinien sondern auch embryonale Zellen sowie in geringerer Intensität auch Harnblasen-Karzinomzellen humanen Ursprungs. Dies läßt darauf schließen, daß diese mAk gegen onkoembryonale/onkofetale Antigene gerichtet sind, die sowohl während der pränatalen Entwicklung vorhanden sind als auch von den Tumorzellen reexprimiert werden.

Die oben referierten Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Angaben von SELA und HURWITZ (1987). Diese Autoren berichten, daß Tumorzellen neuroektodermalen Ursprungs Differenzierungsantigene exprimieren können, die typisch sind für pränatale Entwicklungsstadien normaler Zellen (SEEGER et al., 1982; WIKSTRAND et al., 1982; De MURALT et al., 1985). Diese Antigene können als tumorassoziiert angesehen werden, da

sie im normalen adulten Hirngewebe nicht vorkommen (BOURDON et al., 1984).

Im Gegensatz dazu zeigen drei mAk (MUC 2-39, MUC 5-39, MUC 7-39), die mit membranständigen Epitopen lebender Zellen reagieren, ein spezifisches Bindungsverhalten. Sie erkennen in vitro nur die zur Immunisierung verwendete Gliomzelllinie 86HG-39 und außerdem 85HG-66-T6, jedoch keine weiteren der untersuchten Zellkulturen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß diese mAk gegen gliomassoziierte Antigene im engeren Sinn gerichtet sind.

Die immunchemische Darstellung und die Molekulargewichtsbestimmung der Antigene, die von den Antikörpern MUC 2-63, MUC 2-39, MUC 5-39 und MUC 7-39 erkannt werden ergab, daß die drei mAk gegen 86HG-39 eine scharfe Bande im Bereich von 32 kd färbten, die sich auch nach Behandlung der Membranpräparation mit 2-Mercaptoäthanol noch deutlich darstellte.

MUC 2-63 hingegen reagierte mit einem diffusen Bereich von 80-190 kd mit einer deutlich verstärkten Reaktion bei 85 kd, während nach Reduktion der Disulfidgruppen mit 2-Mercaptoäthanol keine Färbung mehr erkennbar war. Dieser breite Reaktionsbereich ist nicht ungewöhnlich. Auch VENNEGOOR et al. (1985) beschrieben mit Hilfe eines IgG1-Antikörpers ein formalinresistentes melanomsoziiertes Antigen mit einem Molekulargewicht von 25-110 kd, welches nach Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol (Alkylierung von Disulfidgruppen) ebenfalls keine Reaktion mit dem Antikörper zeigte. Die Autoren werten dies als Hinweis auf eine Disulfid-abhängige Antigen-Konfiguration und führen zwei mögliche Erklärungen für die Heterogenität dieses Antigens an: (a) ein unterschiedlicher Zuckeranteil der Antigenmoleküle oder (b) das Vorkommen der antigenen Determinanten auf verschiedenen Glykoproteinen der Zelle.

Nativer MUC 2-63 bindet zwar an unfixierten Gliomzellen, wie mittels IPF und indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, zeigt aber in vitro weder eine spontane noch eine Komplement-vermittelte zytotoxische Wirkung. Auch Morphe, Stoffwechselaktivität und Proliferationsverhalten der behandelten Gliomzellen werden vom nativen Antikörper nicht beeinflusst. Dies dürfte auf dessen IgG1-Subklase zurückzuführen sein, da Maus-IgG1-Antikörper nicht in der Lage sind, Komplement zu fixieren (GODING, 1986).

In zahlreichen Untersuchungen konnte jedoch bei nativen IgG2a-mAk eine antitumorale Wirkung in vitro wie auch in vivo nachgewiesen werden (BERNSTEIN und NOWINSKI, 1982; HERLYN und KOPROWSKI, 1982; SETO et al., 1983; STAVROU et al., 1984; HELLSTRÖM et al., 1985), wobei auch ohne exogene Komplementzugabe eine Proliferationsdepression, verminderte Stoffwechselaktivität und veränderte Oberflächenstruktur der Tumorzellen beobachtet wurden (DIPPOLD et al., 1984; LEDERER et al., 1984; STAVROU et al., 1986a). Eine derartige Wirkung, die möglicherweise auf Membranalterationen nach Antikörperbindung an Zellrezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Hormone (TROWBRIDGE und DOMINGO, 1981; SELA und HURWITZ, 1987) mit resultierendem erniedrigten Stoffwechsel und Eintritt der Tumorzellen in die G_0 -Phase beruht, konnte bei der Anwendung von nativem MUC 2-63 auch nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (bis zu 400 μg Ig/ml) nicht festgestellt werden.

Die Eigenschaft von MUC 2-63, an lebende Zellen zu binden, ließ diesen mAk jedoch als Konjugationspartner für zytotoxische Substanzen geeignet erscheinen. Von einer Koppelung an hochtoxische pflanzliche Lektine wie Abrin oder Ricin wurde Abstand genommen, da ein Molekül dieser Substanzen ausreichen kann, um eine Zelle zu zerstören (EIKLID et al., 1980) und somit auch ein Antikörper, der in den üblichen Spezifitätsuntersuchungen wie IPF nicht nachweisbar mit normalem Gewebe reagiert, in vivo fatale Folgen haben könnte. Solche Immunotoxine (IT) dürften trotz vielversprechender in vitro Untersuchungen in naher Zukunft außer für extrakorporale Behandlungen (VALLERA, 1987) kaum klinische Bedeutung erlangen (EMBLETON, 1987; SELA und HURWITZ, 1987), da der konjugierte Antikörper hochspezifisch sein muß und kaum Untersuchungen über die Stabilität der IT in vivo vorliegen. Darüberhinaus wirken die pflanzlichen Toxine stark immunogen, wodurch ihre klinische Anwendbarkeit weiter eingeschränkt wird (RAMAKRISHNAN und HOUSTON, 1984).

Aus diesen Gründen wurde das herkömmliche Zytostatikum Daunomycin (DM) - ein Antibiotikum mit antitumoralen Eigenschaften - als Konjugationspartner gewählt. Neben den bekannten Nebenwirkungen und der relativ geringen Molekülgröße von DM ist ein weiterer Vorteil darin zu sehen, daß bis zu 10^6 Moleküle nötig sind, um eine Zelle zu zerstören, wo-

durch nur Zellen mit hoher Antigendichte geschädigt werden können (EMBLETON, 1987).

Bei der Konjugation von DM an MUC 2-63 mittels *cis*-Aconitsäureanhydrid konnten durchschnittlich 5,6 Moleküle DM pro Molekül mAk gebunden werden, wobei die Immunreaktivität des Antikörpers hinsichtlich Affinität und Spezifität voll erhalten blieb.

GALLEGO et al. (1984) erreichten mit dieser Methode 3-4 Moleküle gekoppeltes DM und ARNON und SELA (1982a) konnten durch direkte Bindung 2-6 Moleküle DM in ein Antikörpermolekül einführen, wobei die Bindungsaktivität des Antikörpers noch 30-77% betrug. ROWLAND et al. (1983) konjugierten verschiedene Antikörper mit Vindesin und beobachteten, daß die Immunreaktivität des Konjugates, unabhängig von der Subklasse, 2-98% betrug. Auch EMBLETON (1987) berichtet, daß die Bindungsfähigkeit eines "überladenen" Antikörpers stark sinken kann.

Durch Verwendung von makromolekularen "spacern" wie Dextran oder Proteinen kann zwar die Anzahl der gekoppelten DM-Moleküle erhöht werden (bis zu 500 pro Molekül mAk), jedoch sinkt dabei die zytotoxische Wirkung bis auf 12% herab (ARNON und SELA, 1982a). Darüberhinaus wird dadurch das Konjugat sehr groß, was eine schlechte *in vivo* clearance aufgrund mangelnder Gefäßpermeabilität zur Folge hat (GALLEGO et al., 1984).

Als weiterer Faktor muß die Stabilität der Konjugate *in vitro* und insbesondere *in vivo* berücksichtigt werden. Diese beträgt nach EMBLETON (1987) in Abhängigkeit von der verwendeten Konjugationsmethode Minuten bis Tage. Für die DM-mAk - Konjugation scheint *cis*-Aconitsäureanhydrid am besten geeignet zu sein, da diese Konjugate bei intravaskulärem neutralen pH sehr stabil sind und das DM erst nach Aufnahme im sauren lysosomalen Milieu der Targetzelle seine zellschädigende Wirkung entfalten kann. SHEN und RYSER (1981) sowie GALLEGO et al. (1984) konnten zeigen, daß nach Inkubation der Konjugate bei pH 7 und 37°C auch nach drei Tagen kein freies DM nachweisbar war, welches sich jedoch bei einem pH unter 5 abspaltete. Ein weiterer Vorteil dieser Konjugationsmethode besteht darin, daß nach der intrazellulären Freisetzung des DM seine Aminosuckergruppe intakt bleibt, was als Voraussetzung für die zytotoxische Aktivität von DM gewertet wird (ARNON und SELA, 1982a; GALLEGO et al., 1984).

Die proliferationshemmende Wirkung des Konjugates (DM-MUC 2-63) konnte in den durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß bei kurzer Inkubation (1 Stunde) und anschließender dreitägiger Bebrütung der konjugierte Antikörper das Wachstum der Targetzellen stärker hemmte als freies DM in der gleichen Konzentration. Auf Rattenglomzellen, die vom mAk nicht erkannt werden, wirkte nur freies DM antiproliferativ. In dieser Versuchsanordnung zeigt sich der Vorteil der Immunkonjugate sehr deutlich. Durch den mAk wird die zytotoxische Substanz gezielt zu den Tumorzellen gebracht und dort gebunden, während gekoppeltes DM für Antigen - negative Zellen nicht verfügbar ist. Freies DM hingegen wirkt auf alle Zellen gleichermaßen wachstumshemmend.

Nach dreitägiger Inkubation mit konjugiertem Antikörper bzw. freiem DM zeigten beide Substanzen fast identische antiproliferative Eigenschaften gegenüber den Zielzellen. Bei den Rattenglomzellen wirkte freies DM ebenfalls stark wachstumshemmend (81% bei 8 µg freiem DM/ml), während der konjugierte Antikörper nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen eine deutlich geringere Wachstumsdepression bewirkte (14% bei 8 µg gekoppeltem DM/ml). Eine Erklärung für die Wirkung des Konjugates auf die Antigen-negativen Zellen könnte sein, daß diese sehr stoffwechselaktiv sind, wodurch der pH nach drei Tagen ohne Mediumwechsel auf ca. 6,2 abfällt und ein Teil des Konjugates dabei möglicherweise schon instabil werden kann. Desweiteren ist es denkbar, daß konjugierte Antikörpermoleküle von stoffwechselaktiven Zellen im Rahmen normaler Pinozytosevorgänge aufgenommen werden können.

Der MTT-Test, der unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, brachte ähnliche Ergebnisse. Dabei war jedoch nicht festzustellen, ob die verminderte Umsetzung des Vitalfarbstoffes MTT nach Inkubation mit konjugiertem Antikörper bzw. freiem DM wirklich in Zusammenhang mit einer erniedrigten metabolischen Aktivität der Zellen steht oder einfach nur Ausdruck der verminderten Zellzahl ist (MOSMANN, 1983). Ein großer Vorteil dieser Methode ist jedoch, neben der einfachen und raschen Durchführung, daß nur geringe Mengen an Testsubstanzen benötigt werden.

In den durchgeführten Versuchen wurden DM-Konzentrationen von 0,2 - 8 µg/ml getestet. Damit konnte eine Proliferationsdepression der Tumorzellen von 1% (60 min 0,2 µg freies DM/ml) bis 84% (72 Stunden 8 µg gekoppeltes DM/ml) erreicht werden.

GALLEGO et al. (1984) konjugierten einen mAk gegen ein Osteosarkom des Menschen unter Verwendung von cis-Aconitsäureanhydrid und führten ähnliche Zytotoxizitätsuntersuchungen durch. Sie erreichten bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden mit 8 µg DM/ml in gekoppelter oder freier Form eine fast 100%ige Hemmung des ⁷⁵Se-Methionin-Einbaus, während bei einer Konzentration von 1 µg DM/ml das gekoppelte DM einen deutlich schwächeren Effekt (50%) als das freie DM (95%) aufwies. Darüberhinaus zeigten sie, daß nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten der konjugierte Antikörper nur einen Einfluß auf das Stoffwechselverhalten der Zielzellen hatte, nicht jedoch auf Antigen-negative Zellen.

ARNON und SELA (1982a) beobachteten, daß bei sehr kurzer Inkubationsdauer (5 min) gekoppeltes DM schon bei 4 µg/ml wirksam ist (³H-Uridin-Einbau), während freies DM den gleichen Effekt erst bei 20 µg/ml aufweist. Auch BELLES-ISLES et al. (1980) berichten, daß DM nach Konjugation an anti-AFP bzw. anti-CEA Antikörper in vitro wirksamer ist als freies DM.

SELA und HURWITZ (1987) zeigten, daß vor allem niedrige DM-Konzentrationen (1 µg/ml Konjugat) die Proteinsynthese (³H-Thymidin-Einbau) stärker hemmen als freies DM.

Auch im Tierversuch konnte die antiproliferative Wirkung solcher Immunkonjugate nachgewiesen werden. So erreichten HURWITZ et al. (1983b) nach intraperitonealer Injektion von 200 µg DM, gebunden an 1 mg mAk gegen ein B-Lymphom der Maus eine Überlebensrate von annähernd 100% für drei Monate. Dies zeigt, daß die Konjugate in vivo wirklich stabil bleiben, da freies DM ab 100 µg toxisch wirkt und unter 100 µg je Maus keine antitumorale Wirkung auftritt (SELA und HURWITZ, 1987).

Die Untersuchung des in vivo Verhaltens von ¹³¹I-MUC 2-63 und ¹³¹I-MUC 8-22 (ca. 30 µg Antikörper, 200 µCi/7,4 MBq) hat gezeigt, daß lediglich mAk, die in vitro lebende Zellen erkennen auch in vivo eine Bindung mit den Zielzellen eingehen. Dies läßt darauf schließen, daß die Zellen der Linie 85HG-66-T6 auch in vivo Antigene exprimieren, die vom monoklonalen Antikörper MUC 2-63 erkannt werden.

Wie die Tumordarstellung mittels externer Szintigraphie durch MUC 2-63 zeigte, war am 4. Tag p.i. eine deutliche Akkumulation der Radioaktivität im Tumor zu erkennen, die bis zum 12. Tag p.i. anhielt, während die Hintergrundaktivität in blutreichen Organen immer mehr zurücktrat. Auch in der unblockierten Schilddrüse der Tiere war eine deutliche Anreicherung der Aktivität festzustellen, welche als Maß für die in vivo-Dejodierung des Antikörpers gewertet wurde.

Nach zweimaliger Injektion des ^{131}J -MUC 2-63 (jeweils ca. 45 μg Antikörper, 300 $\mu\text{Ci}/11,1 \text{ MBq}$) am 55. und am 76. Tag nach Transplantation der Tumorzellen konnte eine weitgehende Stagnation des Tumorwachstums bei allen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, welche als Folge der lokalen Strahlenwirkung des markierten Antikörpers im Tumorgewebe aufgefaßt wurde. Eine anhaltende Rückbildung der Tumoren war jedoch nicht festzustellen. Dazu sollten eventuell die Zeitabstände zwischen den Injektionen verkürzt oder die Dosis erhöht werden. ZALCBERG et al. (1984) konnten bei einmaliger Injektion von 1 mCi (37 MBq) einen antitumoralen Effekt bei Kolonkarzinomtransplantaten erreichen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß mit MUC 2-63 ein Hybridomklon etabliert werden konnte, dessen sezernierte Antikörper vorwiegend transformierte Gliazellen humanen Ursprungs erkennen. Ohne selbst antitumoral zu wirken, erwies sich dieser mAk als geeignetes Trägermolekül für Daunomycin und Jod-131, wobei seine Bindungsfähigkeit durch die gekoppelten Substanzen weder in vitro noch in vivo beeinträchtigt wurde.

Die Tatsache, daß bei den meisten in vitro wie auch in vivo Experimenten mit monoklonalen Antikörpern gegen TAA nicht alle Tumorzellen dargestellt und zerstört werden konnten, sondern das Tumorwachstum lediglich reduzierten, verdeutlicht die Hauptprobleme dieser Form der Immuntherapie: (a) die Antikörperspezifität einerseits und (b) die Heterogenität der Tumorzellen andererseits. Bis jetzt konnte noch kein mAk produziert werden, der mit sämtlichen Zellpopulationen eines Tumors reagiert.

Eine mögliche Lösung scheint eine Kombination von mAk mit definierten Spezifitäten zu sein, die an verschiedenen tumorassoziierten antigenen Determinanten binden (MARX, 1982; NATALI et al., 1983). Auch die Verwendung von IgG2a-Antikörpern wie MUC 7-39 kann von Vorteil sein, da diese einerseits zytotoxische Substanzen zur Tumorzelle bringen und andererseits auch über die Eigenschaften ihres Fc-Teils (Fixierung von Komplement und Aktivierung von Effektorzellen) die Immunantwort des Patienten auf den Tumor fokussieren könnten. Eine Antiidiotyp-Antwort nach Verabreichung von Maus-mAk wirkt sich möglicherweise positiv auf den Patienten aus, da solche Antikörper ein Spiegelbild des TAA darstellen und somit eine tumorspezifische Immunreaktion auslösen können (KOPROWSKI et al., 1984).

Bei Gliomen ist aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften das Problem der Verfügbarkeit von Therapeutika von besonderer Bedeutung, wobei jedoch gezeigt werden konnte, daß die Blut - Hirn - Schranke bei malignen Tumoren nur partiell intakt ist (VICK et al., 1977; BOURDON et al., 1984). Da für einen Therapieerfolg Gefäßpermeabilität, Vaskularisation und Durchblutungsrate des Tumors entscheidend sind (BOURDON et al., 1984; SELA und HURWITZ, 1987), sollten möglichst kleine Moleküle bevorzugt werden.

Eine Möglichkeit könnte die Anwendung von bivalenten $F(ab')_2$ -Fragmenten sein (EMBLETON, 1987). Durch die Abspaltung des Fc-Fragments mittels Pepsin wird das Antikörpermolekül nicht nur kleiner, sondern auch weniger immunogen. Darüberhinaus kann keine unspezifische Bindung an Zellen mit Fc-Rezeptor, wie zum Beispiel Lymphozyten, erfolgen (BOURDON et al., 1984).

$F(ab')_2$ -Fragmente sind den monovalenten Fab-Fragmenten überlegen, da bei letzteren die Bindungseigenschaften bis zu siebenfach reduziert sein können, während $F(ab')_2$ -Fragmente durch ihre bivalente Bindungsfähigkeit den intakten Antikörpermolekülen entsprechen (RASO et al., 1982; BOURDON et al., 1984).

Bei der Radioimmundiagnostik von Tumoren kann mit bivalenten Fragmenten eine schnellere Zirkulationsclearance erreicht werden, wodurch eine frühere Tumordarstellung erfolgt (WAHL et al., 1983; CARRASQUILLO et al., 1984; STAVROU et al., 1986b) und höhere Tumor/Organ - Verhält-

nisse erzielt werden (DOUILLARD et al., 1985; STAVROU et al., 1986b). WAHL et al. (1983) zeigten, daß bivalente Fragmente eine Halbwertszeit von 24 Stunden haben, während monovalente Fab-Fragmente nur eine Plasmahalbwertszeit von 83 Minuten aufweisen (LARSON et al., 1983).

Radioaktiv markierte mAk haben sowohl immundiagnostisch als auch immuntherapeutisch bereits erste klinische Erfolge gezeigt. PHILLIPS et al. (1983) fusionierten Lymphozyten aus Gliomgewebe mit menschlichen Myelomzellen und konnten dabei einen mAk entwickeln, der nach Markierung mit Jod-131 eine szintigraphische Darstellung des Rezidivs ermöglichte und über 6 Tage in der Zystenflüssigkeit des Tumors nachweisbar war. EPENETOS et al. (1985) konnten bei einem Gliompatienten nach intraarterieller Applikation eines Jod-131 markierten Antikörpers eine vollständige Remission erreichen. ROSEN et al. (1987) erzielten nach i.v. Injektion eines Jod-131 markierten mAk bei allen 6 behandelten Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom eine deutliche Besserung.

Der Vorteil einer solchen Radioimmuntherapie, im Hinblick auf die Heterogenität von Tumorzellen, ist der dabei erzielte "field-effect", wodurch auch Tumorzellen geschädigt werden, die das entsprechende TAA nicht exprimieren (GOLDENBERG et al., 1987).

Da spontane Tumoren des Menschen hinsichtlich Antigenexpression und Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika noch stärker heterogen sind als Zellkulturen oder Transplantationstumoren (EMBLETON, 1987), werden verbesserte Konjugationsformen mit zytotoxischen Substanzen als notwendig erachtet. Bedeutung könnten ferner Konjugationen monoklonaler Antikörper mit unspezifischen Immunmodulatoren wie Interleukinen (induzieren B- und T-Zell vermittelte Immunreaktionen) oder Interferonen erlangen, da neben einer möglichen direkten antiproliferativen Wirkung die Immunantwort des Tumorpatienten (über Aktivierung der natürlichen Killerzellen) auf den Tumor fokussiert wird (BALDWIN et al., 1983; PELHAM et al., 1983; FLANNERY et al., 1984; VOGEL, 1987).

F. ZUSAMMENFASSUNG

Nach 12 Fusionen zwischen Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und sensibilisierten Splenozyten von BALB/c-Mäusen, die mit verschiedenen Gliomzellen (Operationsmaterial oder Zellkulturen) bzw. embryonalen Hirnzellen humanen Ursprungs hyperimmunisiert worden waren, konnten zahlreiche Hybridomklone kultiviert werden. Aus den etablierten Hybridomklonen wurden 13 selektiert, die eine stabile Antikörperproduktion gegen das jeweilige Immunogen aufwiesen und durch charakteristische Bindungseigenschaften ihrer Hybridomprodukte gekennzeichnet waren.

Drei Hybridomklone wurden etabliert, deren sezernierte Antikörper (MUC 2-39, MUC 5-39, MUC 7-39) sowohl an native als auch an fixierte Zellen der zur Immunisierung verwendeten Linie (85HG-39) binden konnten und nur Kreuzreaktionen mit einer (85HG-66-T6) von 6 untersuchten Gliomzelllinien aufwiesen. Das von ihnen erkannte Antigen hatte ein Molekulargewicht von 32 kd.

Neun Hybridomprodukte gegen gliomassoziierte Antigene (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 2-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-66) und ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen embryonale Hirnzellen (MUC 1-9) zeigten Kreuzreaktionen mit allen untersuchten Tumor- und embryonalen Zellen humanen Ursprungs, jedoch keine Bindung an normales adultes Hirngewebe oder Zellen einer anderen Spezies.

Von diesen mAk zeichneten sich MUC 2-63 und MUC 1-66 durch die Eigenschaft aus, an membranständigen Epitopen lebender Zellen sowohl in vitro als auch in vivo zu binden, während die anderen mAk (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-9) mit intrazellulären Strukturen fixierter Zellen reagierten.

MUC 2-63 wurde als IgG1-Antikörper charakterisiert und erkannte Antigenstrukturen in einem Molekulargewichtsbereich von 80-190 kd. Dieser mAk zeigte bei seiner Bindung an Oberflächendeterminanten keine natürliche oder Komplement-vermittelte Zytotoxizität.

Nach Konjugation an Daunomycin blieb die Immunreaktivität von MUC 2-63 erhalten und die antiproliferative Wirkung des Konjugates manifestierte sich in einer deutlichen Wachstumsdepression der Targetzellen in vitro. Dabei zeigte der konjugierte Antikörper, bei kurzer Inkubationsdauer (eine Stunde), eine stärkere Wirksamkeit als freies Daunomycin in gleicher Konzentration (0,2 - 8 µg/ml). Demgegenüber blieb das Wachstum der Zellen, die von MUC 2-63 nicht erkannt wurden, durch den konjugierten Antikörper unbeeinflusst.

Die Bindungsfähigkeit von MUC 2-63 in vivo konnte nach der radioaktiven Markierung mit ^{131}J od (30 µg Antikörper, 200 µCi/7,4 MBq) mittels externer Szintigraphie an Nacktmäusen mit s.c. transplantierten Gliomzellen (85HG-66-T6) nachgewiesen werden. Jodierte mAk hingegen (^{131}J -MUC 8-22), die in vitro nur mit fixierten Zellen reagierten, gingen in vivo keine Bindung mit den Zielzellen ein.

Nach zweimaliger Verabreichung von ^{131}J -MUC 2-63 (jeweils 45 µg Antikörper, 300 µCi/11,1 MBq) an gliomtragende BALB/c-nu/nu-Mäuse konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhebliche Stagnation des Tumorstadiums beobachtet werden.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-86.005.1) durchgeführt.

SUMMARY

BINDING PROPERTIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN GLIOMAS IN VITRO AND IN VIVO

After 12 fusions of mouse myeloma cells (X63-Ag8.653) with splenocytes from BALB/c mice, a number of hybridoma clones were cultivated. The animals were hyperimmunized with either various human glioma cells (biopsy material and cell cultures) or embryonic brain cells.

The 13 hybridoma clones that were selected showed a steady antibody production (IgG of various subclasses) against the immunogen and were recognized by means of the characteristic binding properties of their products.

Three clones were established whose secreted antibodies (MUC 2-39, MUC 5-39, MUC 7-39) were able to bind to native as well as to fixed cells of the immunizing cell line (86HG-39). They showed crossreactions with only one (85HG-66-T6) of 6 other glioma cell lines tested. The corresponding antigen had a molecular weight of 32 kd.

Nine hybridoma products against glioma associated antigens (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 2-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-66) and one monoclonal antibody (McAb) against embryonic brain cells (MUC 1-9) showed crossreactions with all of the tested tumor and embryonic brain cells of human origin. However binding with normal adult brain or cells of another species did not occur. Among these, McAbs MUC 2-63 and MUC 1-66 were able to bind to membrane associated epitopes of living cells in vitro as well as in vivo. Whereas the other McAbs (MUC 8-22, MUC 1-59, MUC 2-59, MUC 1-63, MUC 1-64, MUC 1-65, MUC 2-65, MUC 1-9) reacted with intracellular structures of fixed cells.

MUC 2-63 was identified as an IgG1 antibody and showed reactions with antigenic determinants with a molecular weight from 80 to 190 kd. This McAb had no natural or complement-dependent cytotoxicity when binding to surface determinants.

The immunoreactivity of MUC 2-63 remained after conjugation with daunomycin, and the antiproliferative effect of the conjugate resulted in a growth inhibition of the target cells in vitro. When the time of incubation was kept short (one hour), the conjugated antibody was more effective than the unconjugated daunomycin in the same concentrations (0,2 - 8 $\mu\text{g/ml}$). The growth of the cells, which were not recognized from MUC 2-63, was not influenced, however, by the conjugated antibody.

The binding capability of MUC 2-63 labelled with ^{131}I iodine (30 μg antibody, 200 $\mu\text{Ci/7,4 MBq}$) in vivo was demonstrated by external scintigraphy of nude mice with s.c. xenografts of the human glioma 85HG-66-T6. Iodinated McAbs (^{131}I -MUC 8-22) which reacted in vitro only with fixed cells were not able to bind to the target cells in vivo.

A twofold application of ^{131}I -MUC 2-63 (each time 45 μg antibody, 300 $\mu\text{Ci/11,1 MBq}$) to glioma-bearing BALB/c-nu/nu-mice resulted in a considerable stagnation of tumor growth compared to that of the control animals.

G. LITERATURVERZEICHNIS

ABELEV, G.I.:

Production of embryonal serum alpha-22-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data.

Cancer Res. 28, 1344-1350 (1968)

ALBINO, A.P., LLOYD, K.O., HOUGHTON, A.N., OETTGEN, H.F., OLD, L.J.:
Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient: implications for the study of tumor antigens.

J. Exp. Med. 154, 1764-1778 (1981)

ALBRECHTSEN, M., van GERSTENBERG, A.C., BOCK, E.:

Mouse monoclonal antibodies reacting with human brain glial fibrillary acidic protein.

J. Neurochem. 42, 86-93 (1984)

ARNON, R., SELA, M.:

In vitro and in vivo efficacy of conjugates of daunomycin with anti-tumor antibodies.

Immunol. Rev. 62, 5-27 (1982a)

ARNON, R., SELA, M.:

Targeted chemotherapy: drugs conjugated to anti-tumor antibodies.

Cancer Surv. 1, 429-449 (1982b)

ASHWOOD-SMITH, M.J.:

Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethylsulfoxide.

Nature 190, 1204-1205 (1961)

BALDWIN, R.W., EMBLETON, M.J., PIMM, M.V.:

Monoclonal antibodies for radioimmunodetection of tumours and for targeting.

Bull. Cancer (Paris) 70, 132-136 (1983)

BALDWIN, R.W., EMBLETON, M.J., GARNETT, M.C., PIMM, M.V., PRICE, M.R.,
ARMITAGE, N.A., FARRANDS, P.A., HARDCASTLE, J.D., PERKINS, A.,
ROWLAND, G.F.:

Application of monoclonal antibody 791T-36 for radioimmuno-detection of
human tumors and for targeting cytotoxic drugs.

In: PEETERS, H. (ed.): *Protides of the biological fluids*, Vol.31.

Pergamon Press, Oxford 1984, pp. 775-781

BALLOU, B., LEVIN, G., HAKALA, R.R., SOLTER, D.:

Tumor location detected with radioactivity-labeled monoclonal antibody
and external scintigraphy.

Science 206, 844-847 (1979)

BELLES-ISLES, M., PAGE, M.:

In vitro activity of daunomycin-anti-alpha-foetoprotein conjugate on
mouse hepatoma cells.

Br. J. Cancer 41, 841-842 (1980)

BERNHARD, M.I., FOON, K.A., OELTMANN, T.N., KEY, M.E., HWANG, K.M.,
CLARKE, G.C., CHRISTENSEN, W.L., HOYER, L.C., HANNA, M.G., OLDHAM,
R.K.:

Guinea pig line 10 hepatocarcinoma model: characterization of
monoclonal antibody and in vivo effect of unconjugated antibody and
antibody conjugated to diphtheria toxin A chain.

Cancer Res. 43, 4420-4428 (1983)

BERNIER, L.G., PAGE, M., GAUDREAU, R.C., JOLY, L.P.:

A chlorambucil-anti-CEA conjugate cytotoxic for human colon
adenocarcinoma cells in vitro.

Br. J. Cancer 49, 245-246 (1984)

BERNSTEIN, I.D., NOWINSKI, R.C., TAM, M.R., McMASTER, B., HOUSTON,
L.L., CLARK, E.A.:

Monoclonal antibody therapy of mouse leukemia.

In: KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., BECHTOL, K.B. (eds): *Monoclonal
antibodies*. Plenum Press, New York 1980, pp. 275-291

BERNSTEIN, I.D., NOWINSKI, R.C.:

Monoclonal antibody treatment of transplanted and spontaneous murine leukemia.

In: MITCHELL, M.S., OETTGEN, H.F. (eds): Hybridomas in cancer diagnosis and treatment. Raven Press, New York 1982, pp. 97-112

BIGNER, D.D., BIGNER, S.H., PONTEN, J., WESTERMARK, B., MAHALEY, M.S., RUOSLAHTI, E., HERSCHMAN, H., ENG, L.F., WIKSTRAND, C.J.:

Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 201-229 (1981)

BIGNER, D.D.:

The biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity.

J. Neurosurg. 9, 320-326 (1982)

BIGNER, S.H., MARK, J., BIGNER, D.D.:

Chromosomal composition of four permanent cultured cell lines derived from human gliomas.

Cancer Genet. Cytogenet. 10, 335 (1983)

BILZER, T., STAVROU, D., DAHME, E., ANZIL, A.P.:

Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytotoxicity.

Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)

BJORN, M.J., RING, D., FRANKEL, A.:

Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins.

Cancer Res. 45, 1214-1221 (1985)

BLYTHMAN, H.E., CASELLAS, P., GROS, O., GROS, P., JANSEN, F.K., PAOLUCCI, F., PAU, B., VIDAL, H.:

Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells.

Nature 290, 145-146 (1981)

BORATYNSKI, J., SYPER, L.:

The cytotoxic activity of heterologous anti-L-1210 antibodies conjugated with quinones.

Arch. Immunol. Ther. Exp. 31, 99-106 (1983)

BOURDON, M.A., WIKSTRAND, C.J., FURTHMAYR, H., BIGNER, D.D.:

A human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.

Cancer Res. 43, 2796-2806 (1983)

BOURDON, M.A., COLEMAN, R.E., BIGNER, D.D.:

The potential of monoclonal antibodies as carriers of radiation and drugs for immunodetection and therapy of brain tumors.

Prog. Exp. Tumor Res. 28, 79-101 (1984)

BULLARD, D.E., SCHOLD, S.C., BIGNER, S.H., BIGNER, D.D.:

Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 410-427 (1981)

BULLARD, D.E., BIGNER, D.D.:

Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of primary brain tumors.

J. Neurosurg. 63, 2-16 (1985)

BUMOL, T.F., WANG, Q.C., REISFELD, R.A., KAPLAN, N.O.:

Monoclonal antibody and an antibody-toxin conjugate to a cell surface proteoglycan of melanoma cells suppress in vivo tumor growth.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 529-533 (1983)

BURSHIEL, S.W., MARTIN, J.C., IMAI, K., FERRONE, S., WARNER, N.L.:

Heterogeneity of HLA-A, HLA-B, DR-like and melanoma-associated antigen expression by human melanoma cell lines analyzed with monoclonal antibodies and flow cytometry.

Cancer Res. 42, 4110-4115 (1982)

CAHAN, L.D., IRIE, R.F., SINGH, R., CASSIDENTI, A., PAULSON, J.C.:
Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as
ganglioside GD2.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7629-7633 (1982)

CAIRNCROSS, J.G., MATTES, M.J., BERESFORD, H.R., ALBINO, A.P.,
HOUGHTON, A.N., LLOYD, K.O., OLD, L.J.:
Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal
antibodies: identification of astrocytoma subsets.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5641-5645 (1982)

CARRASQUILLO, J.A., KROHN, K.A., BEAUMIER, P., MCGUFFIN, R.W., BROWN,
J.P., HELLSTRÖM, I., LARSON, S.M.:

Diagnosis and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies
and immune fragments.

Cancer Treat. Rep. 68, 317-328 (1984)

CARREL, S., de TRIBOLET, N., GROSS, N.:

Expression of HLA-DR and common acute lymphoblastic leukemia antigens
on glioma cells.

Eur. J. Immunol. 12, 354-357 (1982a)

CARREL, S., de TRIBOLET, N., MACH, J.P.:

Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas
and neuroblastomas.

Acta Neuropathol. (Berl.) 57, 158-164 (1982b)

CARREL, S., SCHMIDT-KESSEN, A., MACH, J.P., HEUMANN, D., GIRARDET, C.:
Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on
human malignant melanoma cell lines.

J. Immunol. 130, 2456-2460 (1983)

CASELLAS, P., BROWN, J.P., GROS, O., GROS, P., HELLSTRÖM, I., JANSEN,
F.K., PONCELET, P., RONCUCCI, R., VIDAL, H., HELLSTRÖM, K.E.:
Human melanoma cells can be killed in vitro by an immunotoxin specific
for melanoma associated antigen p97.

Int. J. Cancer 30, 437-444 (1982)

COAKHAM, H.B.:

Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.

Nature 250, 328-330 (1974)

COAKHAM, H.B., LAKSHMI, M.S.:

Tumor-associated surface antigen(s) in human astrocytomas.

Oncology 31, 233-243 (1975)

COAKHAM, H.B., KORNBLITH, P.L., QUINDIEN, E.A., POLLOK, L.A., WOOD, W.C., HARNETT, L.C.:

Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: in vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.

J. Nat. Cancer Inst. 64, 223-233 (1980)

CRAVIOTO, H.:

Immunology of experimental brain tumors.

In: WATERS, H. (ed.): Handbook of cancer immunology. Garland STPM Press, New York - London 1978

DeLAND, F.H., GOLDENBERG, D.M.:

Diagnosis and treatment of neoplasms with radionuclide-labeled antibodies.

Semin. Nucl. Med. 15, 2-11 (1985)

De MURALT, B., de TRIBOLET, N., DISERENS, A.-C., STAVROU, D., MACH, J.P., CARREL, S.:

Phenotyping of 60 cultured human gliomas and 34 other neuroectodermal tumors by means of monoclonal antibodies against glioma, melanoma and HLA-DR antigens.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 21, 207-216 (1985)

DeNARDO, S.J., DeNARDO, G.L.:

Tumor therapy with radioactive-labeled antitumor antibodies.

In: MOLOY, P.J., NICOLSON, G.L. (eds): Cellular oncology. Praeger Publishers, New York 1983, pp. 282-292

De TRIBOLET, N., de MURALT, B., DISERENS, A.-C., SCHREYER, M.,
BUCHEGGER, F., CARREL, S., MACH, J.P.:

Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to human gliomas (MAG)
(abstract). Proc. first monoclonal antibody to CNS antigens workshop.
March 31, 1982, Lausanne, Switzerland.

J. Neuroimmunol. 3, 239-290 (1983)

DIENER, E., DINER, U.E., SINHA, A., XIE, S., VERGIDIS, R.:

Specific immunosuppression by immunotoxins containing daunomycin.

Science 231, 148-150 (1985)

DIPPOLD, W.G., LLOYD, K.O., LI, L.T.C., IKEDA, H., OETTGEN, H.F., OLD, L.J.:

Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six
antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118 (1980)

DIPPOLD, W.G., KNUTH, A., MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.H.:

Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal
anti-GD3-ganglioside antibody.

Cancer Res. 44, 806-810 (1984)

DOUILLARD, J.Y., CHATAL, J.F., SACCVINI, J.C., CURTET, C., KREMOR, M.,
PEUVREL, P., KOPROWSKI, H.:

Pharmacokinetic study of radiolabeled anti-colorectal carcinoma
monoclonal antibodies in tumor bearing nude mice.

Eur. J. Nucl. Med. 11, 107-113 (1985)

EIKLID, K., OLSNES, S., PIHL, A.:

Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of
HeLa cells.

Exp. Cell Res. 126, 321-326 (1980)

EMBLETON, M.J., ROWLAND, G.F., SIMMONDS, R.G., JACOBS, E., MARSDEN, C.H.,
BALDWIN, R.W.:

Selective cytotoxicity against human tumor cells by a
vindesine-monoclonal antibody conjugate.

Br. J. Cancer 47, 43-49 (1983)

EMBLETON, M.J.:

Drug-targeting by monoclonal antibodies.

Br. J. Cancer 55, 227-231 (1987)

ENDO, N., TAKEDA, Y., KISHIDA, K., KATO, Y., SAITO, M., UMEMOTO, N.,
HARA, T.:

Target-selective cytotoxicity of methotrexate conjugated with
monoclonal anti-MM46 antibody.

Cancer Immunol. Immunother. 25, 1-6 (1987)

EPENETOS, A.A.:

Antibody-guided irradiation of malignant lesions: Three cases
illustrating a new method of treatment.

Lancet 1, 1441-1443 (1984)

EPENETOS, A.A., COURTENAY-LUCK, N., PICKERING, D., HOOKER, G., DURBIN,
H., LAVENDER, J.P., MCKENZIE, C.G.:

Antibody-guided irradiation of brain glioma by arterial infusion of
radioactive monoclonal antibody against epidermal growth factor
receptor and blood group A antigen.

Br. Med. J. 290, 1463-1466 (1985)

ETTINGER, D.S., ORDER, S.E., WHARAM, M.D., PARKER, M.K., KLEIN, J.L.,
LEICHNER, P.:

Phase I-II study of isotopic immunoglobulin therapy for primary liver
cancer.

Cancer Treat. Rep. 66, 289-297 (1982)

EY, P.L., PROWSE, S.J., JENKIN, C.R.:

Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse
using Protein-A-Sepharose.

Immunochem. 15, 429-436 (1978)

FAIRWEATHER, D.S., BRADWELL, A.R., DYKES, P.W., VAUGHAN, A.T.,
WATSON-JAMES, S.F., CHANDLER, S.:

Improved tumour localisation using indium-111 labelled antibodies.

Br. Med. J. 287, 167-170 (1983)

FALINI, B., TAYLOR, C.R.:

New developments in immunoperoxidase techniques and their application.
Arch. Pathol. Lab. Med. 107, 105-117 (1983)

FARRANDS, P.A., PIMM, M.V., PERKINS, A.C., EMBLETON, M.V., HARDY, J.D., BALDWIN, R.W., HARDCASTLE, J.D.:

Radioimmuno-detection of human colorectal cancers by an antitumor monoclonal antibody.

Lancet 1, 387-400 (1982)

FILIPOVICH, A.H., VALLERA, D.A., YOULE, R.J., QUINONES, R.A., NEVILLE, D.M., Jr., KERSEY, J.H.:

Ex vivo treatment of donor bone marrow with anti-T cell immunotoxins for the prevention of graft vs. host disease.

Lancet 8, 469-471 (1984)

FLANNERY, G.R., PELHAM, J.M., GRAY, D., BALDWIN, R.W.:

Immunomodulation: NK cells activated by interferon-conjugated monoclonal antibody against human osteosarcoma.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20, 791-798 (1984)

FOON, K.A., SCHROFF, R., BUNN, P.A., MAYER, D., ABRAMS, P.G., FER, M.F., OCHS, J., BOTTINO, G., SHERWIN, S.A., CARLO, D.J., HERBERMAN, R.B., OLDDHAM, R.K.:

Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Blood 64, 1085-1093 (1984)

FORTH, W.:

Chemotherapie von Tumoren.

In: FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim - Wien - Zürich 1987, pp. 728-738

FRAKER, P.J., SPECK, J.C.:

Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857 (1978)

GALLATI, H., PRACHT, I.:

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460 (1985)

GALLEGO, J., PRICE, M.R., BALDWIN, R.W.:

Preparation of four daunomycin-monoclonal antibody 791T/36 conjugates with anti-tumor activity.

Int. J. Cancer 33, 737-744 (1984)

GARNETT, M.C., EMBLETON, M.J., JACOBS, E., BALDWIN, R.W.:

Preparation and properties of a drug-carrier-antibody conjugate showing selective antibody-directed cytotoxicity.

Int. J. Cancer 31, 661-670 (1983)

GHOSE, T., GUCLU, A.:

Cure of a mouse lymphoma with radio-iodinated antibody.

Eur. J. Cancer 10, 787-792 (1974)

GHOSE, T., TAI, J., GUCLU, A., NORVELL, S.T., BLAIR, A.H., AQUINO, J.:

Use of cell surface localizing antihepatoma antibody for tumor imaging and therapy with drug-linked antibody.

Transpl. Proc. 12, 192-194 (1980)

GILLILAND, D.G., STEPLEWSKI, Z., COLLIER, R.J., MITCHELL, R.F., CHANG, T.H., KOPROWSKI, H.:

Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4539-4543 (1980)

GODING, J.W.:

Monoclonal antibodies: principles and practice.

Academic Press, London 1986

GOLD, P., FREEDMAN, S.O.:

Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.

J. Exp. Med. 122, 467-481 (1965)

GOLDENBERG, D.M.:

Tumor imaging with monoclonal antibodies.

J. Nucl. Med. 24, 360-362 (1983)

GOLDENBERG, D.M., GOLDENBERG, H., PRIMUS, F.J.:

Cancer diagnosis and therapy with radiolabeled antibodies.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 259-280

GOODMAN, G.D., BEAUMIER, P., HELLSTRÖM, I., FERNYBROUGH, B.,

HELLSTRÖM, K.E.:

Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced cancer.

J. Clin. Oncol. 3, 340-352 (1985)

GRAHMANN, F.C., WIKSTRAND, C.J., BIGNER, D.D.:

Human glioma-associated antigens defined by monoclonal antibodies.

In: BEHAN, P., SPREAFICO, F. (eds): Neuroimmunology. Raven Press, New York 1984, pp. 311-323

GREGORIADIS, G.:

Liposome technology, Vol.3. Targeted drug delivery and biological interaction.

CRC Press, Boca Raton, Florida 1984

HALPERN, S.E., DILLMAN, R.O., WITZTUM, K.F.:

Radioimmuno-detection of melanoma utilizing In-111 96.5 monoclonal antibody: a preliminary report.

Radiology 155, 493-499 (1985)

HAMBLIN, T.J., ABDUL-AHAD, A.K., GORDON, J., STEVENSON, F.K.,

STEVENSON, G.T.:

Preliminary experience in treating lymphocytic leukemia with antibody to immunoglobulin idiotypes on the cell surfaces.

Br. J. Cancer 42, 495-502 (1980)

HASHIMOTO, Y., SUGAWARA, M., MASUKO, T., HOJO, K.:
Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing
subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody.
Cancer Res. 43, 5328-5334 (1983)

HEATH, T.D., MONTGOMERY, J.A., PIPES, J.R., PAPAHAJIOPOULOS, D.:
Antibody-targeted liposomes: increase in specific toxicity of
methotrexate-gamma-aspartate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1377-1381 (1983)

HELLSTRÖM, I., BROWN, J.P., HELLSTRÖM, K.E.:
Melanoma-associated antigen p97 continues to be expressed after
prolonged exposure of cells to specific antibody.
Int. J. Cancer 31, 553-556 (1983)

HELLSTRÖM, I., BRANKOVAN, V., HELLSTRÖM, K.E.:
Strong antitumor activities of IgG3 antibodies to a human
melanoma-associated ganglioside.
Immunology 82, 1499-1502 (1985)

HELSON, L., HELSON, C., WEINBERGER, C.:
DW-1 monoclonal antibody and neuroectodermal tumors.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 24, 130 (1983)

HERLYN, D., HERLYN, M., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.:
Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human
melanoma and colorectal carcinoma.
Eur. J. Immunol. 9, 657-659 (1979)

HERLYN, D., STEPLEWSKI, Z., HERLYN, M., KOPROWSKI, H.:
Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by
monoclonal antibody.
Cancer Res. 40, 717-721 (1980)

HERLYN, D., KOPROWSKI, H.:
IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through
interaction with effector cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4761-4765 (1982)

HERLYN, D., POWE, J., ROSS, A.H., HERLYN, M., KOPROWSKI, H.:
Inhibition of human tumor growth by IgG2a monoclonal antibodies
correlates with antibody density on tumor cells.
J. Immunol. 134, 1300 (1985)

HIRAI, H., TSUKADA, Y., KOJI, T., ISHII, N., KANEDA, H., KASAI, Y.:
Attempts of treatment of hepatoma with antibody to alpha-fetoprotein.
In: PEETERS, H. (ed.): *Protides of the biological fluids*, Vol.30.
Pergamon Press, Oxford 1983, pp. 757-765

HOUGHTON, A.N., BROOKS, H., COTE, R.J., TAORMINA, M.C., OETTGEN, H.F.,
OLD, L.J.:
Detection of cell surface and intracellular antigens by human
monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 158, 53-65 (1983)

HOUGHTON, A.N., MINTZER, D., CORDON-CARDO, C., WELT, S., FLIEGEL, B.,
VADHAM, S., CARSWELL, E., MELAMED, M.R., OETTGEN, H.F., OLD, L.J.:
Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I
trial in patients with malignant melanoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1242-1246 (1985)

HOUSTON, L.L., NOWINSKI, R.C.:
Cell-specific cytotoxicity expressed by a conjugate of ricin and
murine antibody directed against Thy 1.1 antigen.
Cancer Res. 41, 3913-3917 (1981)

HURWITZ, E., LEVY, R., MARON, R., WILCHEK, M., ARNON, R., SELA, M.:
The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies with
retention of both drug and antibody.
Cancer Res. 35, 1175-1181 (1975)

HURWITZ, E., ARNON, R., SAHAR, E., DANON, Y.:
A conjugate of adriamycin and monoclonal antibodies to Thy-1 antigen
inhibits human neuroblastoma cells in vitro.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 417, 125-136 (1983a)

HURWITZ, E., KASHI, R., BUROWSKY, D., ARNON, R., HAIMOVICH, J.:
Site-directed chemotherapy with a drug bound to anti-idiotypic
antibody to a lymphoma cell-surface IgM.
Int. J. Cancer 31, 745-748 (1983b)

HWANG, K.M., FOON, K.A., CHEUNG, P.H., PEARSON, J.W., OLDHAM, R.K.:
Selective antitumor effect of a potent immunoconjugate composed of the
A chain of abrin and a monoclonal antibody to a hepatoma-associated
antigen.
Cancer Res. 44, 4578-4586 (1984)

HWANG, K.M., MORGAN, A.C., Jr., FODSTAD, O., OLDHAM, R.K.:
Radiolocalization of a xenografted human malignant melanoma by a
monoclonal antibody (9.2.27) to a melanoma-associated antigen.
Cancer Res. 45, 4150-4155 (1985)

IMAI, K., NG, A.K., FERRONE, S.:
Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma-associated
antigens.
J. Natl. Cancer Inst. 66, 489-496 (1981)

IMAI, K., NAKANISHI, T., NOGUCHI, T., YACHI, A., FERRONE, S.:
Selective in vitro toxicity of puromycin conjugated to the
monoclonal antibody 225.28S to a human high-molecular-weight
melanoma-associated antigen.
Cancer Immunol. Immunother. 15, 206-209 (1983)

JANSEN, F.K., BLYTHMAN, H.E., CARRIERE, D., CASELLAS, P., GROS, O.,
GROS, P., LAURENT, J.C., PAOLUCCI, F., PAU, B., PONCELET, P., RICHTER,
G., VIDAL, H., VOLSIN, G.A.:
Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent
cytotoxicity.
Immunol. Rev. 62, 185-216 (1982)

JOHNSON, J.R., FORD, C.H.J., NEWMAN, C.E., WOODHOUSE, C.S., ROWLAND, G.F., SIMMONDS, R.G.:

A vindesine-anti-CEA conjugate cytotoxic for human cancer cells in vitro.

Br. J. Cancer 44, 472-475 (1981)

JONAK, Z.L.:

Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

In: KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., BECHTOL, K.B. (eds): Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1980, pp. 405-406

JUNG, G., KOHNLEIN, W., LUDERS, G.:

Biological activity of the antitumor protein neocarzinostatin coupled to a monoclonal antibody by

N-succinimidyl-3-(2'-pyridyldithio)propionate.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 599-606 (1981)

KANELLOS, J., PIETERSZ, G.A., MCKENZIE, I.F.C.:

Studies of methotrexate-monoclonal antibody conjugates for immunotherapy.

J. Natl. Cancer Inst. 75, 319-332 (1985)

KATO, Y., TSUKADA, Y., HARA, T., HIRAI, H.:

Enhanced anti-tumor activity of mitomycin C conjugated with anti-alpha-fetoprotein antibody.

Appl. Biochem. 5, 313-319 (1983)

KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B., RAJEWSKY, K.:

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.

J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

KEENAN, A.M., HARBERT, J.C., LARSON, S.M.:

Monoclonal antibodies in nuclear medicine.

J. Nucl. Med. 26, 531-537 (1985)

KEHAYOV, I.R.:

Tumor-associated water-soluble antigen(s) in human glioblastoma demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

Ann. Immunol. 127, 703-716 (1976)

KENNETT, R.H., GILBERT, F.:

Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.

Science 203, 1120-1121 (1979)

KENNETT, R.H., JONAK, Z.L., BECHTOL, K.B.:

Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.

In: KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., BECHTOL, K.B. (eds): Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1980a, pp. 155-168

KENNETT, R.H.:

Microcytotoxicity assay.

In: KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., BECHTOL, K.B. (eds): Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1980b, pp. 391-392

KIM, E.E., DeLAND, F.H., NELSON, M.O., BENNETT, S.J., SIMMONS, G., ALPERT, E., GOLDENBERG, D.M.:

Radioimmuno-detection of cancer with radiolabeled antibodies to alpha-fetoprotein.

Cancer Res. 40, 3008-3012 (1980)

KIMURA, I., OHNOSHI, T., TSUBOTA, T., SATO, Y., KOBAYASHI, T., ABE, S.:

Production of tumor antibody-neocarzinostatin (NCS) conjugate and its biological activities.

Cancer Immunol. Immunother. 7, 235-242 (1980)

KIRCH, M.E., HAMMERLING, U.:

Immunotherapy of murine leukemias by monoclonal antibody. I. Effect of passively administered antibody on growth of transplanted tumor cells.

J. Immunol. 127, 805-810 (1981)

KÖHLER, G., MILSTEIN, C.:

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497 (1975)

KOPROWSKI, H., HERLYN, D., LUBECK, M., de FREITAS, E., SEARS, H.F.:

Human anti-idiotype antibodies: is the modulation of the immune response beneficial for the patient?

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 216-218 (1984)

KORNB�ITH, P.L., DOHAN, F.C., WOOD, W.C., WHITEMAN, B.O.:

Human astrocytoma: serum-mediated immunologic response.

Cancer 33, 1512-1519 (1974)

KROLICK, K.A., VILLIMEZ, C., ISAKSON, P., UHR, J.W., VITETTA, E.S.:

Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A chain of ricin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5419-5423 (1980)

KROLICK, K.A., YUAN, D., VITETTA, E.S.:

Specific killing of a human breast carcinoma cell line by a monoclonal antibody coupled to the A-chain of ricin.

Cancer Immunol. Immunother. 12, 39-41 (1981)

KROLICK, K.A., UHR, J.W., SLAVIN, S., VITETTA, E.S.:

In vivo therapy of a murine B cell tumor using antibody-ricin A-chain immunotoxins.

J. Exp. Med. 155, 1797-1809 (1982a)

KROLICK, K.A., UHR, J.W., VITETTA, E.S.:

Selective killing of leukemia cells by antibody-toxin conjugates: implications for autologous bone marrow transplantation.

Nature 295, 604-605 (1982b)

KULKARNI, P.N., BLAIR, A.H., GHOSE, T.I.:

Covalent binding of methotrexate to immunoglobulins and the effect of antibody-linked drug on tumor growth in vivo.

Cancer Res. 41, 2700-2706 (1981)

KYHSE-ANDERSON, J.:

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffertank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biophys. Biochem. Meth. 10, 203-209 (1985)

LARSON, S.M., CARRASQUILLO, J.A., KROHN, K.A., BROWN, J.P., MCGUFFIN, R.C., FERENS, J.M., GRAHAM, M.M., HILL, L.D., BEAUMIER, P.L., HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I.:

Localization of p97 specific Fab fragments in human melanoma as a basis for radiotherapy.

J. Clin. Invest. 72, 2101-2114 (1983)

LEDERER, T., STAVROU, D., MELLERT, W., ZÄNKER, K.S.:

Induction of surface changes, membrane traffic alteration and growth delay on rat glioma cells by a monoclonal antibody.

Br. J. Cancer 50, 567-568 (1984)

LEMONNIER, F., BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., BENACERRAF, B.:

Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1229-1233 (1977)

LEVIN, L.V., GRIFFIN, T.W., HAYNES, L.R., SEDOR, C.J.:

Selective cytotoxicity for a colorectal cell line by a monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody coupled to the A chain of ricin.

J. Biol. Resp. Modif. 1, 149-162 (1982)

LEVY, J.A., LEE, H.M., KAWAHATA, R.T., SPITLER, L.E.:

Purification of monoclonal antibodies from mouse ascites eliminates contaminating infectious mouse type C viruses and nucleic acids.

Clin. Exp. Immunol. 56, 114-120 (1984)

LIAO, S.K., CLARKE, B.J., KWONG, P.C., BRICKENDEN, A., GALLIE, B.L.,
DENT, P.B.:

Common neuroectodermal antigens on human melanoma, neuroblastoma,
retinoblastoma, glioblastoma and fetal brain revealed by hybridoma
antibodies raised against melanoma cells.

Eur. J. Immunol. 11, 450-454 (1981)

LITTLEFIELD, J.W.:

Selection of hybrids from mastings of fibroblasts in vitro and their
presumed recombinations.

Science 145, 709 (1964)

LLOYD, K.O.:

Human tumor antigens: detection and characterization with monoclonal
antibodies.

In: HERBERMAN, R.B. (ed.): Basic and clinical tumor immunology.

Nijhoff, Boston 1983, pp. 159-214

LLOYD, K.O.:

Human tumor antigens: targets for mouse monoclonal antibodies.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in
radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York
1987, pp. 8-27

LOEFFEL, S.C., GILLESPIE, G.Y., MIRMIRAN, S.A., MILLER, E.W., GOLDEN,
P., ASKIN, F.B., SIEGAL, G.P., HILL, C.:

Cellular immunolocalization of S 100 protein within fixed tissue
sections by monoclonal antibodies.

Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 117-122 (1985)

MACHY, P., BARBET, J., LESERMAN, L.D.:

Differential endocytosis of T and B lymphocyte surface molecules
evaluated with antibody bearing fluorescent liposomes containing
methotrexate.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4148-4152 (1982)

MANABE, Y., TSUBOTA, T., HARUTA, Y., OKAZAKI, M., HAISA, S., NAKAMURA, K., KIMURA, I.:

Production of a monoclonal antibody-bleomycin conjugate utilizing dextran T 40 and the antigen targeting cytotoxicity of the conjugate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 1009-1014 (1983)

MARX, J.L.:

Monoclonal antibodies in cancer.
Science 216, 283-285 (1982)

McKEARN, T.J.:

Method for growing hybridomas in rats or mice.
In: KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., BECHTOL, K.B. (eds): Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1980, pp. 403-404

MEEKER, T.C., LOWDER, J., MALONEY, D.G., MILLER, R.A., THIELEMANS, K., WARNKE, R., LEVY, R.:

A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B-cell malignancy.
Blood 65, 1349-1363 (1985)

MILLER, R.A., MALONEY, D.G., WARNKE, R., LEVY, R.:

Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody.
N. Engl. J. Med. 306, 517-522 (1982)

MILLER, R.A., OSCROFF, A.R., STRATLE, P.T., LEVY, R.:

Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma.
Blood 62, 995-998 (1983)

MINNA, J.D., CUTTITTA, F., ROSEN, S., BUNN, P.A., CARNEY, D.N., GAZDAR, A.F., KRASNOW, S.:

Methods for production of monoclonal antibodies with specificity for human lung cancer cells.
In Vitro 17, 1058-1070 (1981)

MITCHELL, K.F., FUHRER, J.P., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.:

Biochemical characterization of human melanoma cell surfaces: dissection with monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7287-7291 (1980)

MOLDOFSKY, P.J., SEARS, H.F., MULHEARN, C.B., Jr., HAMMOND, N.D., POWE, J., GATENBY, R.A., STEPLEWSKI, Z.:

Detection of metastatic tumor in normal-sized retroperitoneal lymph nodes by monoclonal-antibody imaging.

N. Engl. J. Med. 311, 106-107 (1984)

MORGAN, A.C., Jr., GALLOWAY, D.R., REISFELD, R.A.:

Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma-specific glycoprotein.

Hybridoma 1, 27-36 (1981)

MORGAN, A.C., Jr., PAVANASASIVAM, G., HWANG, K.M., WOODHOUSE, C.S., SCHROFF, R.W., FOON, K.A., OLDHAM, R.K.:

Preclinical and clinical evaluation of a monoclonal antibody to a human melanoma-associated antigen.

In: PEETERS, H. (ed.): Protides of the biological fluids. 32nd annual colloquium. Elsevier, Amsterdam 1985, pp. 773-777

MORGAN, A.C., Jr., PEARSON, J.W., OLDHAM, R.K.:

Preclinical evaluation of immunoconjugates.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 241-258

MOSMANN, T.:

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays.

J. Immunol. Meth. 65, 5563 (1983)

MURRAY, J.L., ROSENBLUM, M.G., SOBOL, R.E., BARTHOLOMEW, R.M., PLAGER, C.E., HAYNIE, T.P., JAHNS, M.F., GLENN, H.J., LEMKI, L., BENJAMIN, R.S., PAPADOPOULOS, N., BODDIE, A.W., FRINCKE, J.M., DAVID, G.S., CARLO, D.J., HERSH, E.M.:

Radioimmunoimaging in malignant melanoma with ¹¹¹In-labeled monoclonal antibody 96.5.

Cancer Res. 45, 2376-2381 (1985)

NADLER, L.M., STASHENKO, P., HARDY, R., KAPLAN, W.D., BUTTON, L.N., KUFÉ, D.W., ANTMAN, K.H., SCHLOSSMAN, S.F.:

Serotherapy of a patient with monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen.

Cancer Res. 40, 3147-3154 (1980)

NAKAPOULOU, L., ZINOZI, M., THEODOROPoulos, G., PAPACHARALAMPOUS, N.:
Carcinoembryonic antigen detection by immunocytochemical methods in carcinomas of the colon and stomach.

Dis. Colon Rectum 26, 269-274 (1982)

NAKATA, K., FURUKAWA, R., KONO, K., MORO, T., SATO, A., KUSUMOTO, Y., ISHII, N., MUNEHISA, T., KOJI, T., NAGATAKI, S.:

Tumor-serum ratio of alpha-fetoprotein and radioimmunolocalization of primary liver cancer.

Tumor Biol. 5, 161-169 (1984)

NATALI, P.G., CAVALIERE, R., BIGOTTI, A., NICOTRA, M.R., RUSSO, C., NG, A.K., GIACOMINI, P., FERRONE, S.:

Antigenic heterogeneity of surgically removed primary and autologous metastatic human melanoma lesions.

J. Immunol. 130, 1462-1466 (1983)

NEXØ, B.A.:

A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies.

Virology 77, 849-852 (1977)

NOACK, E.:

Stoffe zur Behandlung maligner Tumoren.

In: AMMON, H.P.T. (Hrsg.): Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1981, pp. 618-637

OELTMAN, T.N., HEATH, E.C.:

A hybrid protein containing the toxic subunit of ricin and the cell-specific subunit of human chorionic gonadotropin.

J. Biol. Chem. 254, 1028-1031 (1979)

OGER, J., SZUCHET, S., ANTEL, J., ARNASON, B.G.W.:

A monoclonal antibody against human T suppressor lymphocytes binds specifically to the surface of cultured oligodendrocytes.

Nature 295, 66-68 (1982)

OLDHAM, R.K.:

Monoclonal antibodies in cancer therapy.

J. Clin. Oncol. 1, 582-590 (1983)

OLDHAM, R.K., FOON, K.A., MORGAN, A.C., Jr., WOODHOUSE, C.S., SCHROFF, R.W., ABRAMS, P.G., FER, M., SCHOENBERGER, C.S., FARRELL, M., KIMBALL, E., SHERWIN, S.A.:

Monoclonal antibody therapy of malignant melanoma: in vivo localization in cutaneous metastases after intravenous administration.

J. Clin. Oncol. 2, 1235-1244 (1984)

OLDHAM, R.K.:

Perspectives on the use of immunotoxins in clinical medicine.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 281-289

OLSNES, S., PIHL, A.:

Toxic lectins and related proteins.

In: COHEN, P.L., van HEYNINGEN, S. (eds): The molecular actions of toxins and viruses. Elsevier Biomedical Press, New York 1982, pp. 51-105

ORDER, S.E.:

Radioimmunoglobulin therapy of cancer.

Compr. Ther. 10, 9-18 (1984)

OUCHTERLONY, Ö.:

Diffusions-in-gel-methods for immunological analysis II.

Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)

PAGE, M., BELLES-ISLES, M., EDMOND, J.P.:

Daunomycin targeting to human colon carcinoma cells using drug anti-CEA conjugates.

Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 22, 211 (1981a)

PAGE, M., EDMOND, J.P., GAUTHIER, C., DUFOUR, C., INNES, L.:

Drug targeting with monoclonal antibodies.

In: PEETERS, H. (ed.): *Protides of the biological fluids*, Vol.29.

Pergamon Press, Oxford 1981b, pp. 133-136

PATERAKI, E., GUESDON, J.L., SERRIE, C., AVRAMEAS, S.:

TERELISA: the ELISA test performed in terasaki plates.

J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)

PAUL, J.:

Zell- und Gewebekulturen.

W. de Gruyter Verlag, New York - Berlin 1980

PELHAM, J.M., GRAY, J.D., FLANNERY, G.R., PIMM, M.V., BALDWIN, R.W.:

Interferon-alpha conjugation to human osteogenic sarcoma monoclonal antibody 791T/36.

Cancer Immunol. Immunother. 15, 210-216 (1983)

PETERS, J.H., BAUMGARTEN, H., SCHULZE, M.:

Monoklonale Antikörper.

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokio 1985

PFREUNDSCHUH, M., SHIKU, H., TAKAHASHI, T., UEDA, R., RANSOHOFF, J.,

OETTGEN, H.F., OLD, L.J.:

Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5122-5126 (1978)

PHARMACIA LABORATORY SEPARATION DIVISION:

Specific monoclonal antibody purification techniques: the use of Protein-A Sepharose to purify murine IgG monoclonal antibodies.

Separation News 13, Schweden 1986

PHILLIPS, J., ALDERSON, T., SIKORA, K., WATSON, J.:

Localisation of malignant glioma by a radiolabelled human monoclonal antibody.

J. Neurol. Neurosurg. Psych. 46, 388-392 (1983)

PIMM, M.V., JONES, J.A., PRICE, M.R., MIDDLE, J.G., EMBLETON, M.J., BALDWIN, R.W.:

Tumor localization of monoclonal antibody against a rat mammary carcinoma and suppression of tumor growth with adriamycin-antibody conjugates.

Cancer Immunol. Immunother. 12, 125-134 (1982)

POSNER, M.R., ANTONIOU, D., GRIFFIN, J., SCHLOSSMAN, S.F., LAZARUS, H.:

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.

J. Immunol. Meth. 48, 23-31 (1982)

PUKEL, C.S., LLOYD, K.O., TRAVASSOS, L.R., DIPPOLD, W.G., OETTGEN, H.F., OLD, L.J.:

GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterization by mouse monoclonal antibody.

J. Exp. Med. 155, 1133-1138 (1982)

RAMAKRISHNAN, S., HOUSTON, L.L.:

Prevention of growth of leukemia cells in mice by monoclonal antibodies directed against Thy 1.1 antigen disulfide linked to two ribosomal inhibitors: Pokeweed antiviral protein or ricin A chain.

Cancer Res. 44, 1398-1404 (1984)

RANSCHT, B., CLAPSHAW, P.A., PRICE, J., NOBLE, M., SEIFERT, W.:

Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2709-2713 (1982)

RASO, V., RITZ, J., BASALA, M., SCHLOSSMAN, S.F.:

Monoclonal antibody-ricin A chain conjugate selectively cytotoxic for cells bearing the common acute lymphoblastic leukemia antigen.

Cancer Res. 42, 457-464 (1982)

REIF, A.E., ALLEN, J.M.:

The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues.

J. Exp. Med. 120, 413-433 (1964)

RHODES, B.A., TORVESTAD, D.A., BRESLOW, K., REED, K.A., AUSTIN, R.K.:
99m-Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies and antibody fragments.

In: BURCHIEL, S.W., RHODES, B.A. (eds): Tumor imaging. The radiochemical detection of cancer. Masson Publishing, New York 1982, pp. 111-123

RITZ, J., PESANDO, J.M., SALLAN, S.E., CLAVELL, L.A., NOTIS-McCONARTY, J., ROSENTHAL, P., SCHLOSSMAN, S.F.:

Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody.

Blood 58, 141 (1981)

RITZ, J., SCHLOSSMAN, S.F.:

Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma.

Blood 59, 1-11 (1982)

ROSEN, S.T., ZIMMER, A.M., GOLDMAN-LEIKIN, R., GORDON, L.I., KAZIKIEWICZ, J.M., KAPLAN, E.H., VARIAKOJIS, D., MARDER, R.J., DYKEWICZ, M.S., PIERGIES, A., SILVERSTEIN, E.A., ROENIGK, H.H., Jr., SPIES, S.M.:

Radioimmunodetection and radioimmunotherapy of cutaneous T cell lymphomas using an ¹³¹I-labeled monoclonal antibody: an Illinois cancer council study.

J. Clin. Oncol. 5, 562-573 (1987)

ROWLAND, G.F., SIMMONDS, R.G., CORVALAN, J.R.F., MARSDEN, C.H.,
JOHNSON, J.R., WOODHOUSE, C.S., FORD, C.H.J., NEWMAN, C.E.:
The potential use of monoclonal antibodies in drug targeting.
In: PEETERS, H. (ed.): *Protides of the biological fluids*, Vol.29.
Pergamon Press, Oxford 1981, pp. 921-926

ROWLAND, G.F., SIMMONDS, R.G., CORVALAN, J.R.F., BALDWIN, R.W., BROWN,
J.P., EMBLETON, M.J., FORD, C.H.J., HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I.,
KEMSHEAD, J.T., NEWMAN, C.E., WOODHOUSE, C.S.:
Monoclonal antibodies for targeted therapy with vindesine.
In: PEETERS, H. (ed.): *Protides of the biological fluids*, Vol.30.
Pergamon Press, Oxford 1983, pp. 315-319

ROWLAND, G.F., AXTON, C.A., BALDWIN, R.W., BROWN, J.P., CORVALAN,
J.R.F., EMBLETON, M.J., GORE, V.A., HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E.,
JACOBS, E., MARSDEN, C.H., PIMM, M.V., SIMMONDS, R.G., SMITH, W.:
Anti-tumor properties of vindesine-monomonal antibody conjugates.
Cancer Immunol. Immunother. 19, 1-7 (1985)

SARKAN, S., GLASSY, M.C., FERRONE, S., JONES, O.W.:
Cell cycle and the differential expression of HLA-AB and HLA-DR
antigens on human B lymphoid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7297-7301 (1980)

SCHIMMELPFENG, L., LANGENBERG, U., PETERS, J.H.:
Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro.
Nature 285, 661-662 (1980)

SCHNEGG, J.F., DISERENS, A.C., CARREL, S., ACCOLLA, R.S., de TRIBOLET,
N.:
Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981)

SCHROFF, R.W., FOON, K.A., BEATTY, S.M., OLDHAM, R.K., MORGAN,
A.C., Jr.:
Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving
monoclonal antibody therapy.
Cancer Res. 45, 879-885 (1984)

SEARS, H.F., MATTIS, J., HERLYN, D., HÄYNY, P., ATKINSON, B., ERNST, C., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.:

Phase I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumors.

Lancet 1, 762-765 (1982)

SEARS, H.F., HERLYN, D., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.:

Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinomas.

J. Biol. Resp. Modif. 3, 138-150 (1984)

SEEGER, R.C., ROSENBLATT, H.M., IMAI, K., FERRONE, S.:

Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma and sarcoma cells defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

SEEGER, R.C., DANON, Y.L., RAYNER, S.A., HOOVER, F.:

Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma and teratoma cells with a monoclonal antibody.

J. Immunol. 128, 983-989 (1982)

SELA, M., HURWITZ, E.:

Conjugates of antibodies with cytotoxic drugs.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 189-216

SETO, M., TAKAHASHI, T., NAKAMURA, S., MATSUDAIRA, Y., NISHIZUKA, Y.:

In vivo antitumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes.

Cancer Res. 43, 4768-4773 (1983)

SHAPIRO, J.R., YUNG, W.A., SHAPIRO, W.R.:

Isolation, karyotype and clonal growth of heterogenous subpopulations of human malignant gliomas.

Cancer Res. 41, 23-59 (1981)

SHAPIRO, J.R., SHAPIRO, W.R.:

The subpopulations and isolated cell types of freshly selected high grade human gliomas. Their influence on the tumors evolution in vivo and behavior and therapy in vitro.

Cancer Metast. Rev. 4, 107-124 (1985)

SHEIK, K.M.A., APUZZO, M., KOCHSIEK, K.R., WEISS, M.H.:

Malignant glial neoplasms: definition of a humoral host response to tumor-associated antigens.

J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)

SHEN, W.C., RYSER, H.J.P.:

Cis-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 102, 1048-1054 (1981)

SIKORA, K., ALDERSON, T.:

Human hybridomas from malignant gliomas.

Lancet 2, 11-14 (1982)

SMYTH, M.J., PIETERZ, G.A., CLASSON, B.J., MCKENZIE, I.F.C.:

Specific targeting of chlorambucil to tumor with use of monoclonal antibodies.

J. Natl. Cancer Inst. 76, 503-510 (1986)

SOLHEID, C., LAURO, G., PALLADINE, G.:

Two separate membrane-bound antigens on human glioma cells in tissue culture detected with sera from glioma patients by immunofluorescence.

J. Neurol. Sci. 30, 55-64 (1976)

SPITLER, L.E., del RIO, M., KHENTIGAN, A., SCANNON, P.:

Therapy of patients with malignant melanoma using Xomazyme-Mel, a monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain immunotoxin: results of phase I trial.

J. Cell Biochem. (Suppl.) 10 B, 54 (1986)

SPITLER, L.E.:

Phase I clinical trials with immunotoxins.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 290-300

SPITZ, M., SPITZ, L., THOPE, R., EUGUI, E.:

Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies.

J. Immunol. Meth. 70, 39-43 (1984)

STAVROU, D., ELLING, H., OSTERKAMP, U.:

Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.

Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)

STAVROU, D., ANZIL, A.P., ELLING, H.:

Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.

Acta Neuropath. (Berl.) 43, 111-117 (1978a)

STAVROU, D., ELLING, H., HAGLID, K.G.:

Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in experimental rabbit gliomas.

J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978b)

STAVROU, D., HULTEN, M., ANZIL, A.P., BILZER, T.:

The humoral response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.

Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)

STAVROU, D., HULTEN, M., BILZER, T.:

Chemical modification and antigenicity of glioma cells.

Acta Neuropath. (Suppl.) VII, 75-78 (1981)

STAVROU, D., SÜSS, C., BILZER, T., KUMMER, U., de TRIBOLET, N.:

Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines derived from experimental brain tumors.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

STAVROU, D., MELLERT, W., BILZER, T.:

Monoclonal antibody treatment of cultivated glioma cells.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 107, 27 (1984)

STAVROU, D., MELLERT, W., BILZER, T., SENEKOWITSCH, R., KEIDITSCH, E.,
MEHRAEIN, P.:

Radioimmunodetection of gliomas by administration of radiolabelled
monoclonal antibodies. Experimental data.

Anticancer Res. 5, 147-156 (1985a)

STAVROU, D., MELLERT, W., BILZER, T., SENEKOWITSCH, R., KEIDITSCH, E.,
MEHRAEIN, P.:

Localization of experimental glioma grafts by means of iodinated
monoclonal antibodies and radionuclide imaging.

Acta Neuropathol. (Berl.) 66, 340-342 (1985b)

STAVROU, D., MELLERT, W., MELLERT, U., KEIDITSCH, E., BISE, K.,
MEHRAEIN, P.:

Growth inhibition of experimental glioma grafts by monoclonal antibody
treatment.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 112, 111-118 (1986a)

STAVROU, D., GLÄSSNER, H., BILZER, T., SENEKOWITSCH, R., KEIDITSCH,
E., MEHRAEIN, P.:

Radioimaging of experimental glioma grafts using F(ab')₂-fragments of
monoclonal antibodies.

Anticancer Res. 6, 897-904 (1986b)

STAVROU, D., KEIDITSCH, E., SCHMIDBERGER, F., BISE, K., FUNKE, I.,
EISENMENGER, W., KURRLE, R., MARTIN, B., STOCKER, U.:

Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity
pattern.

J. Neurol. Sci. 80, 205-220 (1987)

SUGASAWARA, R.J., CAHOON, B.E., KARU, A.E.:

The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis and growth rate of hybridomas.

J. Immunol. Meth. 79, 263-265 (1985)

SUZUKI, T., SATO, E., GOTO, K., KATSURADA, Y., UNNO, K., TAKAHASHI, T.:

The preparation of mitomycin C, adriamycin and daunomycin covalently bound to antibodies as improved cancer chemotherapeutic agents.

Chem. Pharm. Bull. 29, 844-848 (1981)

TAKAHASHI, H., HERLYN, D., ATKINSON, B., POWE, J., RODECK, U., ALAVI, A., BRUCE, D.A.:

Radioimmuno-detection of human glioma xenografts by monoclonal antibody to epidermal growth factor receptor.

Cancer Res. 47, 3847-3850 (1987)

TOBIN, S.:

Charakterisierung eines Leukozyten-Antigens beim Haushuhn.

Diss. med. vet., München (1987)

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J.:

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)

TRITTON, T.R., YEE, G.:

The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells.

Science 217, 248-250 (1982)

TROUILLAS, P.:

Carcinofetal antigen in rat glial tumors.

Lancet 2, 552 (1971)

THORPE, P.E., MASON, D.W., BROWN, A.N.F., SIMMONDS, S.J., ROSS, W.C.,
CUMBER, A.J., FORRESTER, J.T.:

Selective killing of malignant cells in a leukemic rat bone marrow
using an antibody-ricin conjugate.

Nature 297, 594-596 (1982)

THORPE, P.E., ROSS, W.C., BROWN, A.N.F., MYERS, C.D., CUMBER, A.J.,
FOXWELL, B.M., FORRESTER, J.T.:

Blockade of the galactose-binding sites of ricin by its linkage to
antibody. Specific cytotoxic effects of the conjugates.

Eur. J. Biochem. 140, 63-71 (1984)

TROWBRIDGE, I.S., DOMINGO, D.L.:

Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and antibody conjugates
kill human tumor cells.

Nature 294, 171-173 (1981)

TSUKADA, Y., BISCHOF, W.K.-D., HIBI, N., HIRAI, H., HURWITZ, E., SELA,
M.:

Effect of a conjugate of daunomycin and antibodies to rat
alpha-fetoprotein on the growth of alpha-fetoprotein-producing tumor
cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 621-625 (1982a)

TSUKADA, Y., HURWITZ, E., KASHI, R., SELA, M., HIBI, N., HARA, A.,
HIRAI, H.:

Chemotherapy by intravenous administration of conjugates of daunomycin
with monoclonal and conventional anti-rat alpha-fetoprotein
antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7896-7899 (1982b)

TSUKADA, Y., KATO, Y., UMEMOTO, N., TAKEDA, Y., HARA, T., HIRAI, H.:

An anti-alpha-fetoprotein-daunomycin conjugate with a novel
poly-L-glutamic acid derivate as intermediate drug carrier.

J. Natl. Cancer Inst. 73, 721-729 (1984)

TSUKADA, Y., OHKAWA, K., HIBI, N.:

Suppression of human alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma growth in nude mice by an anti-alpha-fetoprotein antibody-daunorubicin conjugate with poly-L-glutamic acid derivative as intermediate drug carrier.

Br. J. Cancer 52, 111-116 (1985)

TUNG, E., GOUST, J.M., CHEN, W.Y., KANG, S.S., WANG, I.Y., WANG, A.C.:
Cytotoxic effect of anti-idiotypic antibody-chlorambucil conjugates against human lymphoblastoid cells.

Immunology 50, 57-64 (1983)

VADIA, P., BLAIR, A.H., GHOSE, T.:

Tumor and tissue distribution of a methotrexate-anti-EL-4 immunoglobulin conjugate in EL-4 lymphoma-bearing mice.

Cancer Res 44, 4263-4266 (1984)

VALLERA, D.A.:

The use of immunotoxins in bone marrow transplantation: eradication of T-cells and leukemic cells.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 217-240

VENNEGOOR, C., CALAFAT, J., HAGEMAN, P., v.BUITENEN, F., JANSSEN, H., KOLK, A.:

Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C-3.

Int. J. Cancer 35, 287-295 (1985)

VICK, N.A., KHANEDEKAR, J.D., BIGNER, D.D.:

Chemotherapy of brain tumors: the blood-brain-barrier is not a factor.

Arch. Neurol. 34, 523-526 (1977)

VOGEL, C.-W.:

Antibody conjugates without inherent toxicity: the targeting of cobra venom factor and other biological response modifiers.

In: VOGEL, C.-W. (ed.): Immunoconjugates. Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer. Oxford University Press, New York 1987, pp. 170-188

VOLLMERS, H.P., BIRCHMEIER, W.:

Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B 16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3729-3733 (1983)

WAHL, R.L., PARKER, C.W., PHILPOTT, G.W.:

Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂.

J. Nucl. Med. 24, 317-325 (1983)

WAHLSTRÖM, T., SAKSELA, E., TROUPP, H.:

Cell bound antigliar immunity in patients with malignant tumors of the brain.

Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)

WAHLSTRÖM, T., LINDNER, E., SAKSELA, E., WESTERMARK, B.:

Tumor specific membrane antigens in established cell lines from gliomas.

Cancer 34, 274-279 (1974)

WEINSTEIN, J.N., PARKER, R.J., KEENAN, A.M., DOWER, S.K., MORSE, H.C., SIEBER, S.M.:

Monoclonal antibodies in the lymphatics: toward the diagnosis and therapy of tumor metastases.

Science 218, 1334 (1982)

WEINSTEIN, J.N., STELLER, M.A., KEENAN, A.M., COVELL, D.G., KEY, M.E., SIEBER, S.M., OLDHAM, R.K., HWANG, K.M., PARKER, R.J.:

Monoclonal antibodies in the lymphatics: selective delivery to lymph node metastases of a solid tumor.

Science 222, 423-426 (1983)

WESTERWOUT, R.J.:

Improved fusion methods. IV technical aspects.

J. Immunol. Meth. 77, 181-196 (1985)

WIKSTRAND, C.J., MAHALEY, M.S., BIGNER, D.D.:

Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

WIKSTRAND, C.J., BIGNER, D.D.:

Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

WIKSTRAND, C.J., BIGNER, S.H., BIGNER, D.D.:

Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

WIKSTRAND, C.J., BIGNER, D.D.:

Use of monoclonal antibodies in neurobiology and neurooncology.

In: SELL, S., REISFELD, R. (eds): Monoclonal antibodies in cancer. Humana Press, Clifton, New Jersey 1985, pp. 365-397

YEH, M.J., HELLSTRÖM, I., BROWN, J.P., WARNER, G.H., HANSEN, J.A., HELLSTRÖM, K.E.:

Cell surface antigen of a human melanoma identified by monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2927-2931 (1979)

YEH, M.J., HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E.:

Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.

J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)

ZALCBERG, J.R., THOMPSON, C.H., LICHTENSTEIN, M., MCKENZIE, I.F.:

Tumor immunotherapy in the mouse with the use of ¹³¹I-labeled monoclonal antibodies.

J. Natl. Cancer Inst. 72, 697-704 (1984)

Bei allen, die mir auf vielfältige Weise bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou für seine intensive und freundliche Betreuung, sowie der Ermöglichung wiederholter Auslandsaufenthalte und der kritischen Korrektur des Manuskripts.

Frau D. Wallmann war mir bei der Durchführung der Experimente eine unschätzbare Hilfe.

Für ihre technische Hilfeleistung bedanke ich mich bei Frau A. Lechner.

Herrn M. Urban danke ich für die Möglichkeit, seine Textverarbeitungsanlage zu benutzen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Kollegen Herrn G. Minkus und Frau A. Bruckner für die freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie Herrn Dr. K.-H. Jaschke für die große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen bedanken.

Lebenslauf

- 1959 geboren am 6. Mai in München
Vater: Erich Martin, Ingenieur
Mutter: Josefine Martin, geb. Herold
- 1965-1969 Besuch der Grundschule in Pöding
- 1969-1972 Besuch des Gymnasiums in Grafing
- 1972-1975 Besuch des Gymnasiums in Vaterstetten
- 1975-1979 Besuch des Gymnasiums in Ising
- 1979 27. Juni: Reifezeugnis
- 1979-1985 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1985 31. Oktober: Tierärztliche Prüfung
1. Dezember: Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof. Dr. Dr. D. Stavrou) der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1986 1. Juli bis 31. Dezember: Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
2. Oktober: Approbation als Tierärztin
- 1987 Seit 1. Januar freie Forschungstätigkeit am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, mit einem Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in Bayern.

